

**Zur Bedeutung des Vektors *Ixodes ricinus* und  
verschiedener Wirtsspezies für die Verbreitung  
zeckenassoziierter Krankheitserreger**

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von

**Dipl. Biol. Jan Franke**  
geboren am 14. 12. 1977 in Rudolstadt

Dekan: Prof. Dr. Frank H. Hellwig

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Dorn, Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Süss, Jena
3. Gutachter: Prof. Dr. Ute Mackenstedt, Hohenheim

Datum der Disputation: 12. April 2010

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Der Vektor <i>Ixodes ricinus</i> .....</b>	<b>4</b>
2.1.1	Bedeutung als Vektor .....	4
2.1.2	Lebensweise und Entwicklungszyklus.....	4
<b>2.2</b>	<b><i>Borrelia</i> spp. ....</b>	<b>6</b>
2.2.1	Morphologie, Taxonomie und Verbreitung .....	6
2.2.2	Genom und ausgewählte Antigene.....	9
2.2.3	Krankheitsbild .....	10
2.2.4	Reservoirwirte .....	11
<b>2.3</b>	<b>Emerging Infectious Diseases.....</b>	<b>12</b>
2.3.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	12
2.3.1.1	Morphologie und Taxonomie .....	12
2.3.1.2	Krankheitsbild und Pathogenese.....	13
2.3.1.3	Vektoren, Reservoirwirte und Verbreitung .....	13
2.3.2	<i>Rickettsia</i> spp.....	14
2.3.2.1	Morphologie und Taxonomie .....	14
2.3.2.2	Krankheitsbild und Pathogenese.....	14
2.3.2.3	Vektoren, Reservoirwirte und Verbreitung .....	16
2.3.3	<i>Babesia</i> spp. ....	17
2.3.3.1	Morphologie und Taxonomie .....	17
2.3.3.2	Krankheitsbild und Pathogenese.....	19
2.3.3.3	Vektoren, Reservoirwirte und Verbreitung .....	19
<b>2.4</b>	<b>Globale Erwärmung und zeckenassoziierte Erkrankungen .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Eigene Untersuchungen .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.2.1	Geräte und Chemikalien .....	25
3.2.1.1	Pufferlösungen.....	27

3.2.2	Untersuchungsgebiete .....	28
3.2.2.1	Reifenstein .....	28
3.2.2.2	Greifswalder Oie .....	29
3.2.2.3	Weitere Untersuchungsgebiete an der Ostsee.....	30
3.2.3	Probengewinnung .....	30
3.2.4	DNA-Aufreinigung .....	32
3.2.5	PCR-Nachweismethoden.....	32
3.2.5.1	<i>Borrelia</i> spp. (MICHEL et al. 2003) .....	32
3.2.5.2	Andere Erreger .....	34
3.2.6	Speziesdifferenzierung und Verifizierung positiver Proben .....	35
3.2.6.1	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus .....	35
3.2.6.2	Sequenzierung.....	37
3.2.7	Serologie .....	37
3.2.8	Auswertungsmethoden .....	38
3.2.8.1	Geldokumentation.....	38
3.2.8.2	Sequenzanalyse .....	38
3.2.8.3	Statistik .....	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Fangzahlen und Gesamtprävalenzen .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2</b>	<b>Zecken von Vögeln .....</b>	<b>40</b>
4.2.1	Infestation.....	40
4.2.2	Infektionen mit Borrelien .....	41
4.2.3	Infektionen mit Anaplasmen und Rickettsien .....	46
4.2.4	Infektionen mit Babesien.....	47
<b>4.3</b>	<b>Proben von Kleinsäugetern .....</b>	<b>49</b>
4.3.1	Infestation.....	49
4.3.2	Infektionen mit Borrelien .....	49
4.3.3	Serologische Untersuchungen.....	52
4.3.4	Infektionen mit Anaplasmen und Rickettsien .....	53
4.3.5	Infektionen mit Babesien.....	54
<b>4.4</b>	<b>Freilandgefangene Zecken.....</b>	<b>56</b>
4.4.1	Infektionen mit Borrelien .....	57
4.4.2	Infektionen mit Anaplasmen und Rickettsien .....	59

4.4.3	Infektionen mit Babesien .....	59
<b>4.5</b>	<b>Koinfektionen mit verschiedenen Pathogenen .....</b>	<b>60</b>
<b>4.6</b>	<b>Vergleich der Prävalenzen verschiedener Pathogene .....</b>	<b>62</b>
4.6.1	<i>Borrelia</i> spp. ....	63
4.6.2	Emerging Pathogens .....	64
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
<b>5.1</b>	<b><i>Ixodes ricinus</i> als Vektor .....</b>	<b>68</b>
5.1.1	Fangzahlen und Infestation .....	68
5.1.2	Gesamtprävalenzen im Vergleich mit Inzidenzen und Seroprävalenzen .....	71
<b>5.2</b>	<b>Pathogene in Zecken verschiedenen Ursprungs .....</b>	<b>73</b>
5.2.1	<i>Borrelia</i> spp. ....	73
5.2.1.1	Vögel .....	73
5.2.1.2	Kleinsäuger .....	76
5.2.1.3	Wirtssuchende Zecken und Vergleich mit gesogenen Larven .....	79
5.2.2	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	81
5.2.2.1	Vögel .....	81
5.2.2.2	Kleinsäuger .....	82
5.2.2.3	Wirtssuchende Zecken und Vergleich mit gesogenen Larven .....	83
5.2.3	<i>Rickettsia</i> spp. ....	84
5.2.3.1	Vögel .....	84
5.2.3.2	Kleinsäuger .....	85
5.2.3.3	Wirtssuchende Zecken und Vergleich mit gesogenen Larven .....	86
5.2.4	<i>Babesia</i> spp. ....	87
5.2.4.1	Vögel .....	87
5.2.4.2	Kleinsäuger .....	88
5.2.4.3	Wirtssuchende Zecken und Vergleich mit gesogenen Larven .....	89
5.2.5	Koinfektionen .....	90
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
	<b>Summary .....</b>	<b>96</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>I</b>

<b>Anhang.....</b>	<b>XVII</b>
<b>GenBank-Zugriffsnummern der Referenzsequenzen .....</b>	<b>XVII</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>Publikationen und Tagungsbeiträge.....</b>	<b>XIX</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>XX</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>XXI</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1	Der dreiwirtige Lebenszyklus von <i>I. ricinus</i> .....	6
Abb. 2	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Borrelien. ....	7
Abb. 3	<i>A. phagocytophilum</i> in einem neutrophilen Granulozyten.....	13
Abb. 4	Aktin-basierte Bewegung von <i>R. conorii</i> in einer Wirtszelle.....	15
Abb. 5	Der Entwicklungszyklus von <i>Babesia</i> spp.....	18
Abb. 6	Fangflächen in Reifenstein.....	28
Abb. 7	Fanggebiet 1 („Klärteich“) und Fangfläche 2 („Schafsteich“) in Reifenstein .....	29
Abb. 8	Luftansicht der Greifswalder Oie.....	29
Abb. 9	Fanggebiete der Freilandzecken in der Ostseeregion.....	30
Abb. 10	Zeckenentnahme bei einem Rotkehlchen.....	31
Abb. 11	Agarosegel mit RFLP Muster eines <i>ospA</i> -Amplikons aus einer mit Borrelien infizierten <i>I. ricinus</i> -Nymphe .....	36
Abb. 12	Spektrum der <i>Borrelia</i> -Genospezies in infizierten <i>I. ricinus</i> -Zecken, die an Vögeln parasitierten.....	42
Abb. 13	Phylogenetische Analyse der sequenzierten <i>ospA</i> -Fragmente aus an Vögeln parasitierenden Zecken.....	43
Abb. 14	Verteilung der <i>Borrelia</i> -Genospezies bei an Vögeln parasitierenden Larven und Nymphen .....	45
Abb. 15	Phylogenetische Analyse der sequenzierten <i>ospA</i> -Fragmente aus an Kleinsäufern parasitierenden Zecken.....	51
Abb. 16	Verteilung der Anti-Borrelien-IgG-Titer bei Kleinsäufern aus Reifenstein.....	52
Abb. 17	Spektrum der <i>Borrelia</i> -Genospezies in wirtssuchenden <i>I. ricinus</i> -Zecken .....	57
Abb. 18	Phylogenetische Analyse der sequenzierten <i>ospA</i> -Fragmente aus Freilandzecken.....	58
Abb. 19	Vergleich der Prävalenzen zeckenassoziierter Erreger in subadulten Stadien von <i>I. ricinus</i> verschiedenen Ursprungs innerhalb eines Untersuchungsgebietes .....	66
Abb. 20	Vergleich von Kleinsäufern und Vögeln aus Reifenstein im Bezug auf deren Infestation mit positiven Zecken.....	67
Abb. 21	Schematische Darstellung der Koinfektionen in <i>I. ricinus</i> -Zecken unterschiedlichen Ursprungs.....	91

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1	Bislang beschriebene Genospezies des LB-Komplexes und ihre Verbreitungsgebiete ...	8
Tab. 2	Die wichtigsten klinischen Manifestationen der Lyme Borreliose. ....	10
Tab. 3	Von <i>I. ricinus</i> übertragene SFG-Rickettsien in Europa .....	17
Tab. 4	Von <i>I. ricinus</i> übertragene humanpathogene <i>Babesia</i> spp. in Europa.....	21
Tab. 5	Verwendete Geräte .....	25
Tab. 6	Verwendete Chemikalien .....	26
Tab. 7	Physikalische Bedingungen für die Amplifikation eines <i>ospA</i> Genfragments aus <i>Borrelia</i> spp. ....	33
Tab. 8	Physikalische Bedingungen der erregerspezifischen PCR.....	34
Tab. 9	Oligonukleotid-Primer und Zielgene der erregerspezifischen PCR .....	35
Tab. 10	RFLP Fragmentlängen in Deutschland vorkommender <i>Borrelia</i> <i>OspA</i> -Genospezies ...	36
Tab. 11	RFLP Fragmentlängen von <i>A. phagocytophilum</i> , <i>Rickettsia</i> spp. und <i>Babesia</i> spp.....	37
Tab. 12	Individuenzahlen und Infestation der in Reifenstein und auf der Greifswalder Oie gefangenen Vogelarten mit <i>I. ricinus</i> -Zecken.....	41
Tab. 13	Prävalenzen von <i>Borrelia</i> -Genospezies in Zecken ausgewählter Vogelarten .....	44
Tab. 14	Koinfektionen mit <i>Borrelia</i> -Genospezies in von Vögeln abgesammelten Zecken .....	46
Tab. 15	Prävalenzen von <i>A. phagocytophilum</i> in von Vögeln abgesammelten Zecken .....	47
Tab. 16	Prävalenzen und Speziesdifferenzierung von SFG-Rickettsien in von Vögeln abgesammelten Zecken .....	47
Tab. 17	Prävalenzen und Speziesdifferenzierung von <i>Babesien</i> in von Vögeln abgesammelten Zecken.....	48
Tab. 18	<i>Borrelia</i> Genospezies in von Kleinsäufern abgesammelten Zecken aus Reifenstein....	50
Tab. 19	<i>A. phagocytophilum</i> und <i>Rickettsia</i> Spezies in von Kleinsäufern abgesammelten Zecken aus Reifenstein.....	53
Tab. 20	<i>Babesia</i> spp. in von Kleinsäufern abgesammelten Zecken aus Reifenstein .....	55
Tab. 21	Fangzahlen wirtssuchender <i>I. ricinus</i> -Zecken in Reifenstein und vier Gebieten der deutschen Ostseeregion .....	56
Tab. 22	Interspezifische Koinfektionen in Zecken unterschiedlichen Ursprungs.....	60
Tab. 23	Übersicht der in Zecken unterschiedlichen Ursprungs aufgetretenen Koinfektionen ....	61
Tab. 24	Wirtstiere, die mit Zecken mit verschiedenen Pathogen-Infektionen infestiert waren ....	62



**Abkürzungsverzeichnis**

Ø	Mittelwert (z.B. mittlere Infestation)
A.	<i>Anaplasma</i>
Ap.	<i>Apodemus</i>
Ad	Adulte
afz	<i>afzelii</i>
aqua bidest.	aqua bidestillata
B.	<i>Borrelia</i>
Ba.	<i>Babesia</i>
bav	<i>bavariensis</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
bur	<i>burgdorferi</i>
CRASP	complement regulatory acquiring protein
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
D.	<i>Dermacentor</i>
Dbp	decorin-binding-protein
DEPC beh.	behandelt mit Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E.	<i>Ehrlichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EID	Emerging Infectious Disease(s)
EM	Erythema migrans
EP	Emerging Pathogen(s)
et al.	und andere
FSMEV	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
gar	<i>garinii</i>
gltA	Zitratsynthase-Gen
HGA	Humane Granulozytäre Anaplasmosse

<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
IFT	Immunfluoreszenstest
IgG	Immunglobulin G
La	Larve(n)
LB	Lyme Borreliose
LPS	Lipopolysaccharid
<i>M.</i>	<i>Myodes</i>
Mb	Megabasenpaare
NCBI	National Center for Biotechnology Information
n.i.	nicht identifizierbar
Ny	Nymphe(n)
Osp	outer surface protein
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>R.</i>	<i>Rickettsia</i>
rRNA	ribosomale RNA
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SFG	spotted-fever-group
spp.	species pluralis
ssp.	subspecies
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBD	tick-borne disease(s)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TG	Typhus-Gruppe
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit(s)
<i>val</i>	<i>valaisiana</i>

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Neben der Lyme-Borreliose (LB), der häufigsten durch Arthropoden übertragenen Infektionskrankheit in den nördlichen gemäßigten Klimazonen, gewannen auch andere zeckenassoziierte Erkrankungen (engl. tick-borne diseases, TBD) als sogenannte „Emerging Infectious Diseases“ (EID, neu auftretende Infektionskrankheiten) in den letzten Jahren in Deutschland immer mehr an Bedeutung. Wichtige Pathogene aus dieser Gruppe sind *Anaplasma phagocytophilum*, der Erreger der Humanen Granulozytären Anaplasmosen (HGA), Rickettsien der Zeckenbissfieber-Gruppe (engl. spotted fever group, SFG) und Babesien als einzellige Parasiten von Mensch und Tier. Obwohl diesen Erregern aufgrund der Vielfalt unterschiedlicher Symptome und Erkrankungen mit teils schweren Verläufen eine immer größere Bedeutung zukommt, ist bislang nur sehr wenig über ihre Ökologie, wie z.B. Reservoir-Spezifität und Transmissionszyklen, bekannt. Die Erfassung entsprechender Daten ist jedoch unabdingbar für eine verlässliche Risikoabschätzung und die Entwicklung prophylaktischer Maßnahmen wie beispielsweise die Impfstoffentwicklung gegen Spezies-spezifische Antigene.

Die Lyme-Borreliose ist mit geschätzten 60.000 Neuerkrankungen beim Menschen pro Jahr, allein in Deutschland (MEHNERT 2005), die häufigste zeckenassoziierte Infektionskrankheit in Europa. Da in Deutschland nicht in allen Bundesländern eine Meldepflicht besteht, liegt die Dunkelziffer der Erkrankungen vermutlich viel höher. Einige Symptome dieser Erkrankung sind zwar bereits im 19. Jahrhundert in Europa beschrieben wurden (BUCHWALD 1883), jedoch wurde *Borrelia burgdorferi* erst rund 100 Jahre später als bakterieller Erreger der Lyme-Borreliose beschrieben (BURGDORFER et al. 1982). Aufgrund der Vielzahl klinischer Manifestationen, die unterschiedliche Organsysteme einschließen kann, wird die Lyme-Borreliose auch als „Chamäleon“ unter den Infektionskrankheiten bezeichnet.

*Anaplasma phagocytophilum* trat, damals noch als *Ehrlichia* spp. bezeichnet, bereits seit den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts als Erreger des Zeckenfiebers bei Schafen in Schottland auf und galt seit den 1950er Jahren als Verursacher des Pasteur-Fiebers bei Rindern in England (BEUGNET und MARIE 2009). Im Jahre 1969 wurde das Bakterium, damals noch als *E. equi*, als Erreger der Granulozytären Ehrlichiose bei Pferden identifiziert. In den USA wurde 1990 bei einem Patienten, der zwei Wochen nach einem Zeckenstich an einer fieberhaften Erkrankung verstarb, der erste Fall einer Humanen Granulozytären Anaplasmosen (HGA) beschrieben (CHEN et al. 1994). Diese Erkrankung trat dann 1997 erstmals in Europa auf (BEUGNET und MARIE 2009). Seitdem wurde in den

USA und in einigen Teilen Europas ein Anstieg an HGA Erkrankungen beobachtet, sodass die HGA als EID eingestuft wurde (DUMLER et al. 2005).

Zeckenbiss-assoziierte Rickettsiosen sind akute, nicht selten auch lebensbedrohliche Infektionen. Sie werden durch Rickettsien der Zeckenbissfieber-Gruppe ausgelöst. Manche Spezies (z.B. *R. rickettsii*) können auch asymptomatisch in Lymphknoten persistieren (WALKER et al. 2003). Einige Studien bringen *R. helvetica* mit chronischer Perimyokarditis, Sarkoidose oder plötzlichem Herztod in Verbindung (NILSSON et al. 1999a; NILSSON et al. 2002). Bereits Ende des 19. Jahrhunderts gab es in den USA erste beschriebene Fälle des „Rocky Mountain spotted fevers“ (RMSF). Das Mittelmeerfleckenfieber (engl. Mediterranean spotted fever) wurde erstmals in den 1970er Jahren in Süd- und Südwesteuropa beschrieben. Bislang werden global mehr als zehn verschiedene, durch SFG-Rickettsien verursachte Erkrankungen unterschieden (BASSETTI 2004).

Neben bakteriellen und viralen Krankheitserregern werden auch Parasiten von Zecken auf Mensch und Tier übertragen. Protozoen der Gattung *Babesia* sind bereits seit 1888 als Erreger von Erkrankungen von Reh- und Rotwild, Pferden, Hunden und v.a. Rindern, bekannt (SÜSS et al. 2004). Im Jahre 1956 trat der erste Fall einer fatalen humanen Babesiose im ehemaligen Jugoslawien auf (SKRABALO und DEANOVIC 1957). Seitdem wurden, v.a. aus den USA, immer mehr Fälle gemeldet, meist verursacht von *Ba. microti* und oft einhergehend mit lebensbedrohlichen Symptomen (HERWALDT et al. 2003; HOMER et al. 2000). Die meisten der 39 bisher in Europa gezählten Fälle einer humanen Babesiose wurden dagegen von *Ba. divergens* hervorgerufen (HUNFELD et al. 2008). Im Jahr 2007 wurde in Jena der erste Fall einer humanen, durch *Ba. microti* verursachten autochthonen Erkrankung in Europa gemeldet (HILDEBRANDT et al. 2007).

Das Vorkommen aller vier in dieser Arbeit behandelten Pathogene ist eng an die Verbreitung und die Aktivität ihrer Vektoren und Reservoirs gebunden. Aktuelle Daten zeigen, dass es in den letzten Jahren zu einer Veränderung der Aktivität von *Ixodes ricinus*, dem Hauptvektor in Mitteleuropa, sowie zu einer Erhöhung der Inzidenz zeckenassoziiierter Erkrankungen kam (SÜSS 2003). Als Ursache für diese Entwicklung wird die globale Erwärmung diskutiert (GRAY et al. 2009). Bis heute fehlen jedoch detaillierte Daten über das Vorkommen, vor allem der sogenannten „Emerging Pathogens“ in Deutschland sowie ihre potentiellen Reservoirwirte. So ist beispielsweise das Wirbeltierreservoir von SFG-Rickettsien noch unbekannt. Auch zur Rolle verschiedener Vogelarten als mögliche Reservoirs für die in dieser Arbeit behandelten Erregergruppen existieren bislang nur wenige Studien. Es ist daher umso wichtiger, ökologische Daten über die Verbreitung zeckenassoziiierter Erreger und ihre Beziehung zu Wirten und Vektoren in ihren natürlichen Lebenszyklen zu erheben.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Erreger mit Hilfe molekularbiologischer Methoden und phylogenetischer Analysen in Zecken verschiedenen Ursprungs nachzuweisen und zu charakterisieren, um damit die Bedeutung einzelner Wirtsspezies und des Vektors *Ixodes ricinus* in ihren Transmissionszyklen zu beleuchten.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Der Vektor *Ixodes ricinus*

#### 2.1.1 Bedeutung als Vektor

Der zur Familie der Schildzecken (*Acari: Ixodidae*) zählende Gemeine Holzbock *Ixodes ricinus* ist die häufigste Zeckenart und Hauptvektor für *Borrelien* der LB Gruppe in Mitteleuropa (EISEN und LANE 2002). Sein Verbreitungsgebiet erstreckt sich über Europa, Nordafrika und Westasien.

Neben *Borrelien* überträgt er auch andere Erreger, wie das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus FSMEV (SÜSS et al. 2006), *A. phagocytophilum* (HARTELT et al. 2004; HILDEBRANDT et al. 2002), SFG-Rickettsien (HORNOK et al. 2009) und Babesien (GRAY 2004) auf Mensch und Tier.

Dabei können auch Mischinfektionen in den verschiedensten Kombinationen auftreten (BELONGIA 2002; CHRISTOVA und GLADNISHKA 2005; FINGERLE et al. 1999; HILDEBRANDT et al. 2003; HOVIUS et al. 2007; LEVIN und FISH 2000a; SKOTARCZAK et al. 2002; WOJCIK-FATLA et al. 2009). Diese führen beim Patienten oft zu einer Verstärkung der Krankheitssymptome sowie Diagnose- und Behandlungsproblemen (BENACH et al. 1985; KRAUSE et al. 1992; KRAUSE et al. 1996; KRAUSE et al. 2002; NADELMAN et al. 1997; OLESON et al. 2003).

Für einige Erreger, wie SFG-Rickettsien (BURGDORFER et al. 1979; GODDARD 2003; KELLY und MASON 1991; REHACEK 1984; RUDAKOV et al. 1999; SCHRIEFER und AZAD 1994), bei denen transovariable Übertragung innerhalb des Zeckenzyklus möglich ist, haben Zecken neben der Vektor- auch eine Reservoirfunktion. Viele Studien zu dieser Thematik wurden zwar mit anderen Zeckenarten durchgeführt, es gilt aber als gesichert, dass auch *I. ricinus* eine Reservoirfunktion für diese Erreger zugesprochen werden kann (BONNET et al. 2007; BURGDORFER et al. 1979; RAOULT und ROUX 1997).

#### 2.1.2 Lebensweise und Entwicklungszyklus

Zecken besitzen stechend-saugende Mundwerkzeuge, bestehend aus paarigen Cheliceren, Pedipalpen und Hypostom. Da die *I. ricinus* Männchen ihre Mundwerkzeuge nicht zur Nahrungsaufnahme sondern zur Verankerung am Weibchen während der Kopulation benötigen, haben sie ein kürzeres Hypostom mit anders aufgebauten Widerhaken. Das Hallersche Organ, ein grubenförmiger, mit Sinnesborsten ausgestatteter Chemo-, Thermo- und Mechanorezeptor, befindet sich an den Tarsen des ersten

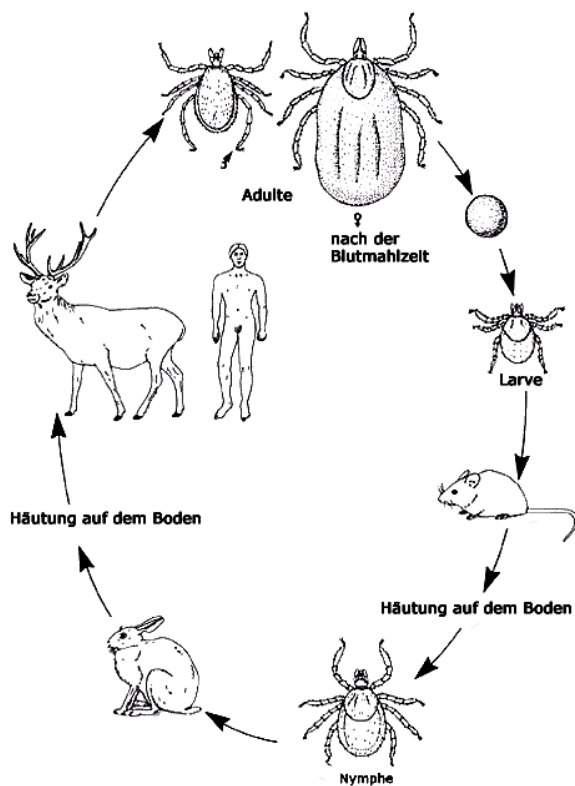
Beinpaares. Dieses der Wirtsfindung dienende Organ nimmt chemische Reize wie CO<sub>2</sub>, Ammoniak oder Milchsäure, aber auch von den Wirtstieren verursachte Erschütterungen und Wärmestrahlung auf (LIEBISCH 1991).

Die Rolle von *I. ricinus* als Vektor ist in der euryphagen Lebensweise dieser Spezies begründet. Der Entwicklungszyklus läuft in drei Stadien ab (Abb. 1) und umfasst ein großes Wirtsspektrum von mehr als 300 Wirbeltierarten (STANEK 2009). Für den Übergang ins nächste Entwicklungsstadium benötigen die Zecken jeweils eine Blutmahlzeit, bei der sie Pathogene von infizierten Reservoirwirten aufnehmen, bzw. Wirtstiere infizieren können. Die 0,6 mm, im gesogenen Zustand bis zu 1,25 mm großen Larven bewohnen die unteren Vegetationsschichten bis zu einer Höhe von 20 cm und saugen vor allem an Kleinsäugetern, in Bodennähe vorkommenden Vögeln sowie Reptilien. Nach dem Saugakt erfolgen die Häutung in der Laubschicht und die Weiterentwicklung zur Nymphe mit einer Körperlänge von 1,2 mm, vollgesogen bis 2 mm. Sie kommen in den Vegetationsschichten bis 40 cm Höhe vor. Ihre bevorzugten Wirte sind mittelgroße Säugetiere sowie Vögel. Sie saugen aber auch an Kleinsäugetern, Weidevieh, Wild und dem Menschen. Nymphen nehmen eine wichtige Rolle im Wirtswechsel von Borrelien ein, da sie, im Gegensatz zu Larven, Kleinsäuger und Vögel infizieren können und diese somit zum Erregerreservoir machen. Dieses Stadium ist am häufigsten am Menschen zu finden (FRANKE et al. 2008). Nach der Blutmahlzeit häuten sich die Tiere erneut und entwickeln sich schließlich zu den 2,4 mm (♂) bis 4,8 mm (♀) großen Adulti. Da sie die Strauchschicht in einer Höhe bis 80 cm bewohnen, sind ihre Hauptwirte große Säugetiere wie Rotwild, Weidevieh, Hunde aber auch der Mensch. Weibliche Tiere benötigen zur Reproduktion eine dritte Blutmahlzeit. Nach der Befruchtung durch das Männchen legen die Weibchen ca. 3000 Eier im Boden ab, aus denen sich wieder Larven entwickeln.

Eine transstadielle Übertragung, also die „Mitnahme“ der Mikroorganismen von einem Zeckenstadium in das nächste, ist bei allen vier in dieser Arbeit untersuchten Erregergruppen bekannt (BONNET et al. 2007; GRAY et al. 2002; OGDEN et al. 1998; RAOULT und ROUX 1997; STANEK et al. 1986). Dadurch ist eine Transmission der Erreger von subadulten und adulten Zeckenstadien auf Wirtstiere möglich. Werden die Pathogene jedoch nicht transovariell im Zeckenzyklus übertragen, gilt dies nicht für Larven (Kap. 2.1.1).

*Ixodes ricinus* kommt vor allem in Parkanlagen, Laub- und Mischwäldern mit gut entwickelter Kraut- und Strauchschicht sowie an Waldrändern vor. Bei einer relativen Luftfeuchte von 80 - 96 % ist diese Zecke in der Lage, Wasser aus der Atmosphäre zu extrahieren (GRAY 1991). Um der Austrocknung zu entgehen, meidet sie stark sonnenexponierte Orte mit geringer Luftfeuchte. Unter einer Temperatur von ca. 5 °C

sind die Tiere inaktiv (GRAY 1984). Der oft zweigipfelige Verlauf der Zeckenaktivität wird stark von den klimatischen Bedingungen bestimmt. Ihre maximale Aktivität zeigen die Zecken meist von Mai-Juni und August-Oktober (Larven), April-Mai und September-Oktober (Nymphen), sowie Mai-Juni und September-Oktober (Adulti) (LIEBISCH 1991). Aufgrund der geringen Luftfeuchte und der hohen Temperaturen sind die Tiere in den heißen Sommermonaten meist weniger aktiv. Neben bimodalen Aktivitätsmustern wurden auch, vor allem in Südeuropa, unimodale Verläufe mit einem Aktivitätshöhepunkt im Winter beobachtet (EISEN und LANE 2002). In den letzten Jahren wurden immer öfter abweichende saisonale Verläufe der Zeckenaktivität registriert (GRAY et al. 2009). Als Ursache hierfür wird vor allem die globale Erwärmung diskutiert (Kap. 2.4).



**Abb. 1** Der dreiwirtige Lebenszyklus von *I. ricinus*.

Die Darstellung zeigt nur einen kleinen Teil des Wirtsspektrums von *I. ricinus*.

(bearbeitet aus <http://www.infektionsbiologie.ch/parasitologie/seiten/modellparasiten/mp06ixod.html> )

## 2.2 *Borrelia* spp.

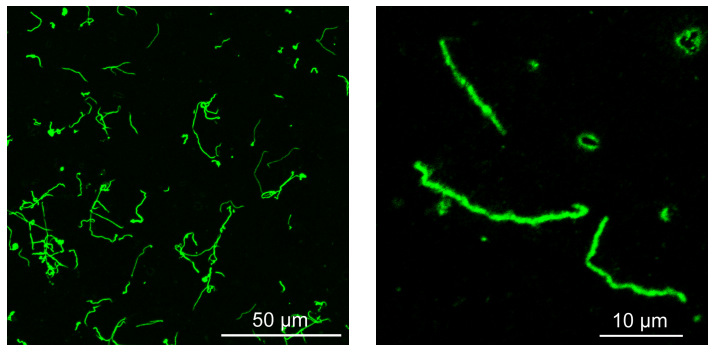
### 2.2.1 Morphologie, Taxonomie und Verbreitung

Borrelien sind gramnegative, chemoheterotrophe und mikroaerophile Spirochäten (*Spirochaetales: Spirochaetaceae*). Ihr Zellkörper zeichnet sich durch eine hohe Motilität aus, ist lang gestreckt und spiralförmig gewunden mit einer Länge von 10 - 30 µm und einem Durchmesser von 0,2 - 0,5 µm (Abb. 2). Im periplasmatischen Raum zwischen der Peptidoglykanschicht und der äußeren Membran besitzen Borrelien Flagellen (MOTALEB



et al. 2000). Sie umschließen den protoplasmatischen Zylinder und bedingen so die Spiralförmigkeit der Zelle (BURGDORFER et al. 1982). Mit ihnen kann sich das Bakterium sowohl entlang der Längsachse, als auch seitlich fortbewegen (GOLDSTEIN et al. 1994).

Neben den Rückfallfieber-Borrelien stellt der früher *B. burgdorferi* s.l. genannte Komplex die wichtigste Borreliengruppe dar. Bislang werden 16 Genospezies unterschieden (Tab. 1). Humanpathogenität wurde bisher für die in Deutschland vorkommenden Spezies *B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis* sp. nov. (früher *B. garinii* OspA Typ 4) und *B. lusitaniae* nachgewiesen (FOLDVARI et al. 2005; HENGGE et al. 2003; HOFMANN 2005; LÜNEMANN und KRAUSE 2003; MARGOS et al. 2009; SCHAARSCHMIDT et al. 2001; STANEK und STRLE 2003).



**Abb. 2 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Borrelien.**

Die Borrelien wurden mit Kleinsäugerserum und sekundär mit einem Alexa Fluor® 488-konjugierten F(ab')<sub>2</sub>-Fragment eines Ziege-anti-Maus IgG markiert. Aufnahme mit konfokalem Laserscanningmikroskop am Institut für Zell- und Neurobiologie der Universität Karlsruhe.

Die Verteilung der Genospezies in Deutschland und Europa ist sehr heterogen und eng an das Vorhandensein von Reservoirwirten gebunden (Kap. 2.2.4). Während beispielsweise *B. lusitaniae* in Portugal die häufigste Spezies ist (DE MISHELIS et al. 2000), ist sie in Deutschland, wo *B. afzelii* und *B. garinii* dominieren (KIPP 2008), nur äußerst selten anzutreffen (RICHTER und MATUSCHKA 2006). Die in den USA fast ausschließlich vorkommende Art *B. burgdorferi* (GATEWOOD et al. 2009; NAU et al. 2009) scheint dagegen in vielen Regionen Deutschlands und Europas eher rar zu sein (BURRI et al. 2007; CISAK et al. 2002; FRANKE et al. 2008; KAMPEN et al. 2004; KIPP et al. 2006b). Die vogelassozierte Spezies *B. valaisiana* wird in Deutschland recht häufig nachgewiesen und ist in einigen Regionen die vorherrschende Art (KAMPEN et al. 2004; KIPP et al. 2006b). Die Genospezies-Verteilung ist jedoch auch in Deutschland einer starken Heterogenität unterworfen. So wurde *B. valaisiana* beispielsweise in Süddeutschland nur sehr selten bzw. gar nicht nachgewiesen (MICHEL et al. 2003; RAUTER et al. 2002), während es im Siebengebirge und in Thüringen die dominierende Art war (KAMPEN et al. 2004; KIPP et al. 2006b).

**Tab. 1      Bislang beschriebene Genospezies des LB-Komplexes und ihre Verbreitungsgebiete**

Die Hauptverbreitungsgebiete sind jeweils mit \* gekennzeichnet. Zum Teil nach MASUZAWA (2004).

Genospezies (Referenz)	Verbreitungsgebiet
<i>B. burgdorferi</i> (BARANTON et al. 1992)	Nordamerika*, Europa
<i>B. garinii</i> (BARANTON et al. 1992)	Europa*
<i>B. afzelii</i> (CANICA et al. 1993)	Europa*, Ost-Russland*, China
<i>B. valaisiana</i> (WANG et al. 1997)	Europa*, Japan
<i>B. lusitaniae</i> (LEVY et al. 1993)	Südwesteuropa*, Mittelmeerraum
<i>B. japonica</i> (KAWABATA et al. 1993)	Japan
<i>B. andersonii</i> (MARCONI et al. 1995)	Nordamerika
<i>B. tanukii</i> (FUKUNAGA et al. 1996)	Japan*, Nepal
<i>B. turdi</i> (MASUZAWA et al. 1996)	Japan
<i>B. bissettii</i> (POSTIC et al. 1998)	Nordamerika
<i>B. sinica</i> (MASUZAWA et al. 2001)	China, Nepal
<i>B. spielmanii</i> (RICHTER et al. 2004)	Mitteleuropa
<i>B. californiensis</i> (POSTIC et al. 2007)	Nordamerika
<i>B. carolinensis</i> (RUDENKO et al. 2009a)	Nordamerika
<i>B. bavariensis</i> sp. nov. (MARGOS et al. 2009)	Mitteleuropa
<i>B. americana</i> (RUDENKO et al. 2009b)	Nordamerika

Die kürzlich neu beschriebenen Arten *B. spielmanii* und *B. bavariensis* sp. nov. wurden in Deutschland bislang nur selten gefunden (FRANKE et al. 2008; HU et al. 2001; KIPP 2008; RICHTER et al. 2004). *Borrelia afzelii* hingegen ist in den meisten Regionen Europas und Deutschlands recht häufig, oft sogar dominierend (RAUTER und HARTUNG 2005). Die Arbeiten von RAUTER et al. (2002; 2005) und KIPP (2008) zeigten, dass selbst innerhalb einzelner Regionen Deutschlands und Europas eine hohe Variabilität in der Genospezieszusammensetzung zu beobachten ist. Die Prävalenz der Erreger ist immer die Folge der Interaktion genetisch diverser Genospezies mit einem noch diverseren Spektrum von Wirbeltierreservoir, während beide Gruppen wiederum durch eine Vielzahl abiotischer und biotischer Faktoren beeinflusst werden (RANDOLPH 2001). Generelle Aussagen über das geografische Vorkommen einzelner Spezies sind deshalb nur unter Berücksichtigung einer meist hohen Varianz zu machen. Dennoch ist eine genaue Kenntnis über die Verbreitung von *Borrelia* Genospezies unabdingbar für das Verständnis der Ökologie der Erreger, das Risikomanagement der Lyme Borreliose, die Erstellung von Risikokarten und die Entwicklung von Impfstoffen.

### 2.2.2 Genom und ausgewählte Antigene

Die Spirochäten der LB Gruppe besitzen, neben einem kleinen linearen Chromosom von 0,91 Mb, 12 lineare und 9 zirkuläre Plasmide. Das komplette Genom ist 1,52 Mb groß und enthält vermutlich nur 1283 Gene (CASJENS et al. 2000; FRASER et al. 1997). Der geringe Guanin/Cytosin Anteil grenzt die Borrelien von den Gattungen *Treponema* und *Leptospira* ab (HYDE und JOHNSON 1984). Die Tatsache, dass einige Gene für Biosynthese-Enzyme fehlen, weist auf die parasitische Lebensweise dieser Bakterien hin (BERGSTROM et al. 2002). Eine Genospeziesdifferenzierung ist anhand einer Vielzahl plasmidcodierter Gene, wie z.B. die für Oberflächenproteine codierenden *ospA* und *ospC* (MICHEL et al. 2003; WANG et al. 1999) möglich. Weitere „housekeeping genes“, die zur Charakterisierung von Genospezies genutzt werden, sind beispielsweise *clpA*, *clpX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *recG*, *rplB*, *uvrA* oder die nicht codierende 5S-23S „intergenic spacer“ Region (MARGOS et al. 2009).

Neben der außerordentlich guten Beweglichkeit und der Zellform (Kap. 2.2.1), die ein Vordringen im Wirtsgewebe ermöglichen, sind Borrelien mit einer Reihe von Antigenen ausgestattet, die für die Pathogenese und die Immunevasion von essentieller Bedeutung sind. Der eigentliche Transmissionsvorgang während des Saugaktes ist erst unzureichend verstanden. Die Erreger wandern während der Blutmahlzeit vom Mitteldarm in das Haemocoel, gelangen dann in die Speicheldrüse und schließlich in das Wirtsgewebe. Es wurde nachgewiesen, dass sich die Spirochäten während des Saugaktes exponentiell in der Zecke vermehren (DE SILVA und FIKRIG 1995; HODZIC et al. 2002).

In den letzten Jahren waren vor allem die immunsuppressiven Erp und CRASP-Proteine der Borrelien Gegenstand der Forschung. Diese Moleküle binden u.a. die Komplement-regulatoren Faktor H und FHL-1 und unterdrücken damit bereits in der saugenden Zecke die Komplementkaskade (SKOTARCZAK 2009). Auch die „outer-surface-proteins“ (Osp) werden intensiv erforscht. Diese spielen sowohl bei der Immunevasion als auch bei der Adhäsion am Wirtsgewebe eine Rolle. Durch Variation der Osp unterlaufen die Spirochäten die Immunantwort des Wirtes (HEFTY et al. 2002). Da sie während des Transmissionsvorgangs unterschiedlich exprimiert werden, sind vermutlich diverse Osp für die Wanderung der Spirochäten vom Mitteldarm in die Speicheldrüsen der Zecken wichtig, wobei der Einfluss der Oberflächenproteine auf diesen Vorgang je nach Genospezies unterschiedlich stark ist (FINGERLE et al. 2002; GILMORE et al. 2001). *OspA*, dessen Gen in der vorliegenden Arbeit als Zielgen genutzt wurde, ist nicht nur ein wichtiges Antigen zur Genospeziesdifferenzierung (FINGERLE et al. 2004; KIPP et al. 2006b; LENČÁKOVÁ et al. 2007; MICHEL et al. 2003), sondern auch Kandidat für einen Impfstoff gegen Lyme-Borreliose (KOIDE et al. 2005; NASSAL et al. 2005).

### 2.2.3 Krankheitsbild

Lyme-Borreliose ist eine multisystemische Erkrankung, die durch eine außerordentliche symptomatische Vielfalt gekennzeichnet ist (Tab. 2). Die Erkrankung kann zu sehr unterschiedlichen klinischen Manifestationen, z.B. im Nervensystem, der Haut oder den Gelenken führen und muss nicht zwangsläufig in verschiedenen Stadien ablaufen (MIELKE und HAHN 2001; STANEK et al. 2002). Die Art der klinischen Ausprägung der Lyme-Borreliose ist unter anderem abhängig von der *Borrelia* Genospezies (Tab. 2), mit welcher der Patient infiziert ist. Hierzu sei allerdings erwähnt, dass einige Genospezies mehrere unterschiedliche Manifestationen hervorrufen können, sodass genaue Vorhersagen der Verlaufsform anhand der *Borrelia* Spezies nicht möglich sind (ANTHONISSEN et al. 1994; BALMELLI und PIFFARETTI 1995; CANICA et al. 1993; DEMAERSCHALCK et al. 1995; VAN DAM et al. 1993).

Borrelien werden erst nach 24h in für eine Infektion ausreichender Dosis auf den Wirt übertragen (STAFFORD und KITRON 2002). Da es bislang noch kein Vakzin gegen LB gibt, besteht die einzige Möglichkeit zur Prävention in der Vermeidung von Zeckenstichen bzw. dem unverzüglichen Entfernen von parasitierenden Zecken.

**Tab. 2 Die wichtigsten klinischen Manifestationen der Lyme Borreliose.**

Neben den häufigen Verlaufsformen (fett) gibt es noch eine Reihe weiterer, selten auftretender Manifestationen. Es werden nicht zwangsläufig alle Stadien durchlaufen. Die hier dargestellten Assoziationen der Verlaufsformen mit *Borrelia* Genospezies sind nicht eindeutig abgrenzbar, sondern bezeichnen besonders häufig von einer bestimmten Genospezies hervorgerufene Krankheitsausprägungen.

Stadium	Zeitraum	Klinische Ausprägung (Genospezies-Assoziation)
I	wenige Tage bis Wochen nach dem Zeckenstich	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Erythema chronicum migrans</b> (<i>B. afzelii</i>, <i>B. spielmanii</i>)</li> <li>• <b>Lymphadenosis benigna cutis</b></li> <li>• asymptomatischer Verlauf oder spontane Ausheilung</li> </ul>
II	1 - 16 Wochen nach dem Zeckenstich	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Meningopolyneuritis Garin-Bujadoux-Bannwarth</b> (<i>B. garinii</i>)</li> <li>• Karditis</li> <li>• heftige Gelenk- und Muskelschmerzen</li> </ul>
III	Monate bis Jahre nach dem Zeckenstich	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Lyme – Arthritis</b> (<i>B. burgdorferi</i>)</li> <li>• <b>Acrodermatitis chronica atrophicans</b> (<i>B. afzelii</i>)</li> <li>• <b>chronische Neuroborreliose</b></li> </ul>

#### 2.2.4 Reservoirwirte

Reservoirwirte sind essentiell für die Verbreitung und die Aufrechterhaltung des Lebenszyklus von Borrelien. Unter Reservoirkompetenz versteht man die Fähigkeit eines Wirtstieres, parasitierende Zecken zu infizieren. Dazu ist es notwendig, dass die Spirochäten sich im Wirt vermehren und im Blut vorhanden sind (Bakteriämie). Um die Reservoirkompetenz eines Tieres festzustellen, kann man verschiedene Methoden anwenden. Zum Einen ist es möglich, in freilebenden Zecken eine Analyse der Blutmahlzeit vorzunehmen und damit Wirts-DNA in der Zecke nachzuweisen (GRAY et al. 1999; KIRSTEIN und GRAY 1996; PICHON et al. 2003). Bei gleichzeitigem Vorhandensein von Erregern lassen sich dadurch Rückschlüsse auf mögliche Reservoirwirte ziehen. Allerdings hat diese Methode nur eine geringe Nachweisquote, v.a. wenn die Blutmahlzeit schon länger zurückliegt (PICHON et al. 2005). Bei der aufwendigeren Xenodiagnostik werden nüchterne Zecken auf infizierte Wirtstiere gesetzt und anschließend auf Krankheitserreger untersucht (HU et al. 2003; HUEGLI et al. 2002). Da eine transovariable Übertragung von Borrelien in *I. ricinus* wenn überhaupt, dann nur äußerst selten (< 1 %) auftritt (MATUSCHKA et al. 1992; ZHIOUA et al. 1994), kann man davon ausgehen, dass Larven vor der ersten Blutmahlzeit nicht infiziert sind. Der Nachweis von Borrelien in parasitierenden Larven ist also ein direktes Indiz für eine Reservoirkompetenz des betreffenden Wirtstieres. Hierzu sei erwähnt, dass sich Zecken unter Umständen auch infizieren können, wenn gleichzeitig eine infizierte Zecke in der Nähe der Einstichstelle am selben Wirt saugt. Dieser Prozess wird Cofeeding-Transmission genannt und tritt selten auch an Wirtstieren auf, die keine Reservoirkompetenz besitzen (GERN und RAIS 1996).

Wichtige Reservoirs für *Borrelia* der LB Gruppe sind Vögel, Kleinsäuger und Reptilien. Es ist bekannt, dass einige Reservoirs mit bestimmten Genospezies assoziiert sind. So werden beispielsweise *B. valaisiana* und *B. garinii* von Vögeln, nicht jedoch von Kleinsäugetieren auf Zecken übertragen (HANINCOVÁ et al. 2003b; TARAGEL'OVÁ et al. 2008). Andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass *B. afzelii* und *B. bavariensis* sp. nov. mit Kleinsäugetieren assoziiert sind (HANINCOVÁ et al. 2003a; HU et al. 2001; HUEGLI et al. 2002; KURTENBACH et al. 1998b). Die vor allem im Mittelmeerraum vorkommende Spezies *B. lusitanae* hat ihr Hauptreservoir vermutlich in Eidechsen (MAJLATHOVÁ et al. 2006; RICHTER und MATUSCHKA 2006). *Borrelia spielmanii* wird mit Bilchen (*Gliridae*) und Igeln in Verbindung gebracht (GERN 2009). *Borrelia burgdorferi* wird dagegen sowohl von Vögeln als auch von Kleinsäugetieren auf Zecken übertragen (WRIGHT et al. 2000). Die Hauptursache für bestimmte Reservoir-Assoziationen liegt in der unterschiedlichen Sensitivität der Genospezies gegen das Komplementsystem des Wirtes begründet

(KURTENBACH et al. 1998a; KURTENBACH et al. 2002b; KURTENBACH et al. 2002c), wobei v.a. die CRASP Proteine eine entscheidende Rolle spielen (Kap. 2.2.2).

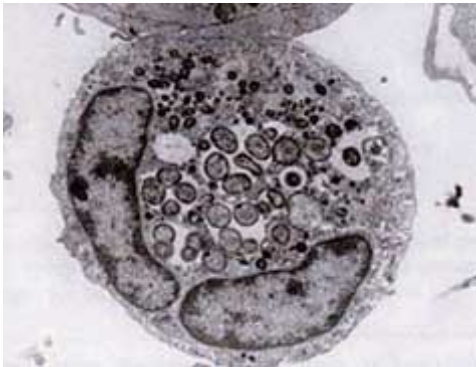
## 2.3 Emerging Infectious Diseases

Unter dem Begriff „Emerging Infectious Diseases“ (EID) fasst man Infektionskrankheiten zusammen, die in den letzten beiden Jahrzehnten neu aufgetreten sind, bzw. deren Vorkommen bisher unbekannte Wirte und neue Verbreitungsgebiete einschließt. Die Ursachen für das Auftreten neuer Infektionskrankheiten können vielfältig sein. Zum einen können natürliche evolutionäre Mechanismen oder ökologische Veränderungen dazu führen, dass Mikroorganismen ihr Wirtsspektrum oder ihren Verbreitungsradius erweitern, zum anderen können die Ursachen auch anthropogener Natur sein. So treten beispielsweise im Zuge der Globalisierung und der globalen Erwärmung (Kap. 2.4, S. 21) neue Krankheitserreger in Europa auf, die bislang nur in anderen, oft sehr eingegrenzten, Regionen der Erde vorkamen. Auch durch die Anwendung moderner Nachweisverfahren werden bisher unbekannte Erreger oft als „Emerging Pathogens“ eingruppiert. Im folgenden Abschnitt wird auf drei Erreger bzw. Erregerkomplexe von EID näher eingegangen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

### 2.3.1 *Anaplasma phagocytophilum*

#### 2.3.1.1 Morphologie und Taxonomie

Das obligat intrazelluläre gramnegative Bakterium *Anaplasma phagocytophilum* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) wurde 2001 als Spezies definiert, die durch phylogenetische Analysen aus dem Erreger der Humanen Granulozytären Ehrlichiose (HGE) sowie den Zoonoseerregern *Ehrlichia equi* und *E. phagocytophila* zusammengefasst wurde (DUMLER et al. 2001). Neben dieser Spezies gibt es noch weitere, v.a. veterinärmedizinisch bedeutsame Arten aus der Familie Anaplasmataceae, wie z.B. *Ehrlichia canis*, der Erreger der Caninen Ehrlichiose. Die Zellform von Anaplasmen ist kokkoid (Abb. 3), kann aber, v.a. in Gewebekultur, auch pleomorph sein. Die Zellen besitzen sehr dünne innere und äußere Bi-Faltblatt-Membranen und werden von einer Wirtsmembran eingeschlossen. Im Gegensatz zu Rickettsien sind bei Anaplasmen keine Verdickungen der Membranen zu beobachten (RIKIHISA 1991). Die Zellwände enthalten keine signifikanten Peptidoglykananteile. In einer Wirtszelle treten *A. phagocytophilum*-Zellen als lose Zellhaufen auf, die im Gegensatz zu *E. canis* kleiner sind und aus weniger Zellen bestehen (RIKIHISA 1991).



**Abb. 3** *A. phagocytophilum* in einem neutrophilen Granulozyten

Aufnahme durch Transmissions-Elektronenmikroskopie.

Foto: V. Popov (DUMLER et al. 2005)

### 2.3.1.2 Krankheitsbild und Pathogenese

Die häufigsten Manifestationen der HGA sind allgemeines Unwohlsein (94 %), Fieber (92 %), Muskelschmerzen (77 %) und Kopfschmerz (75 %). Seltener treten Hautausschlag, Durchfall, Erbrechen, Atemprobleme oder weitere Symptome auf. Viele Infektionen verlaufen inapparent. Schwere Verläufe mit Symptomen wie toxischer Schock, Koagulopathie oder atypischer Pneumonie, wurden in 5 - 7 % der Fälle beobachtet. In sehr seltenen Fällen kann diese Erkrankung zum Tod führen (DUMLER et al. 2005).

Die Zielzellen von *A. phagocytophilum* sind neutrophile Granulozyten, es wurden aber auch schon Morulae in Endothelzellen oder Makrophagen beobachtet (OLANO und WALKER 2002). Bei der Adhäsion an die Wirtszellmembran spielt das major-surface-protein-2 (Msp2) eine entscheidende Rolle (PARK et al. 2003). Durch Genkonversion von *msp2* entsteht eine Antigendiversität, die wichtig für die Immunevasion und die Persistenz im Reservoirwirt ist (PARK et al. 2003; SCORPIO et al. 2004).

Ähnlich wie bei Borrelien, werden pathologische Vorgänge vermutlich nicht durch die Bakterien selbst bzw. infizierte Granulozyten ausgelöst, sondern vielmehr durch die Entzündungsreaktion und andere immunologische Prozesse. Opportunistische Infektionen durch Sekundärerreger, wie Borrelien (Kap. 2.1.1) oder Staphylokokken, Pilze oder Viren, können eine weitere Ursache für mitunter schwere Krankheitsverläufe sein (DUMLER et al. 2005; NADELMAN et al. 1997).

### 2.3.1.3 Vektoren, Reservoirwirte und Verbreitung

Der Lebenszyklus von *A. phagocytophilum* ist erst unzureichend verstanden. Das Bakterium wird in Europa hauptsächlich durch *I. ricinus* (PAROLA et al. 2005a), seltener auch von *I. trianguliceps* (BOWN et al. 2003) übertragen, während in den USA *I. scapularis* der Hauptvektor ist (BAKKEN und DUMLER 2000). *Anaplasma phagocytophilum* ist in Europa weit verbreitet. Untersuchungen an *I. ricinus* in Deutschland ergaben Prävalenzen

von 1 % in Süddeutschland (HARTELT et al. 2004), 0 %-3,8 % in Thüringen (HILDEBRANDT et al. 2002) und 3,9 % in Berlin (PICHON et al. 2006). Auf europäischer Ebene variieren die Prävalenzen von Anaplasmen von 4,4 % in Italien (PICCOLIN et al. 2006), 4,9 % in Polen (WOJCIK-FATLA et al. 2009) und 5,6 % in Spanien (BARANDIKA et al. 2008) über 8,3 % in der Slowakei (DERDÁKOVÁ et al. 2003) und 9 % in Moldawien (KOČI et al. 2007) bis hin zu 23,6 % in Dänemark (SKARPHEDINSSON et al. 2007). Auch Koinfektionen mit anderen Erregern wie z.B. Borrelien wurden in *I. ricinus* detektiert (FINGERLE et al. 1999; HILDEBRANDT et al. 2003; WOJCIK-FATLA et al. 2009).

Transovarielle Transmission von Anaplasmen in *I. ricinus* tritt nicht auf, es sind also Reservoir für die Aufrechterhaltung des Lebenszyklus notwendig (DUMLER et al. 2001). Als Reservoirwirte für *A. phagocytophilum* werden Schafe, Rotwild, sowie Kleinsäuger diskutiert (DE LA FUENTE et al. 2008; LADBURY et al. 2008; LIZ et al. 2000; LIZ 2002; LIZ et al. 2002), wobei die Infektionsdauer bei Kleinsäugetieren allgemein sehr kurz ist und die Erreger meist nicht über den Winter persistieren (BEUGNET und MARIE 2009). Die Rolle von Vögeln im Lebenszyklus der Erreger ist bislang noch unklar, es wird aber angenommen, dass sie für die Verbreitung der Erreger von Bedeutung sind (ALEKSEEV et al. 2001; BJOERSDORFF et al. 2001; IOANNOU et al. 2009; SKOTARCZAK et al. 2006).

### **2.3.2 *Rickettsia* spp.**

#### **2.3.2.1 Morphologie und Taxonomie**

Die ebenfalls zur Ordnung *Rickettsiales* (Familie *Rickettsiaceae*) gehörende Gruppe der Zeckenbissfieber-Rickettsien (engl. spotted fever group, SFG) umfasst mehr als 30 Arten, von denen mindestens 15 humanpathogen sind und weitere 6 im Verdacht stehen, Erkrankungen beim Menschen auszulösen (JADO et al. 2007; PAROLA et al. 2005b). Sechzehn Spezies werden als Emerging Pathogens (oder potentielle EP) bezeichnet, da sie erst nach 1984 mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (PAROLA et al. 2005b). Rickettsien sind obligat intrazelluläre gramnegative Bakterien, die als kurze Stäbchen in Erscheinung treten. Neben der SFG werden noch die Rickettsien der Typhus-Gruppe (TG) und der Tsutsugamushi-Fieber-Gruppe (engl. scrub typhus group) unterschieden (RAOULT und ROUX 1997).

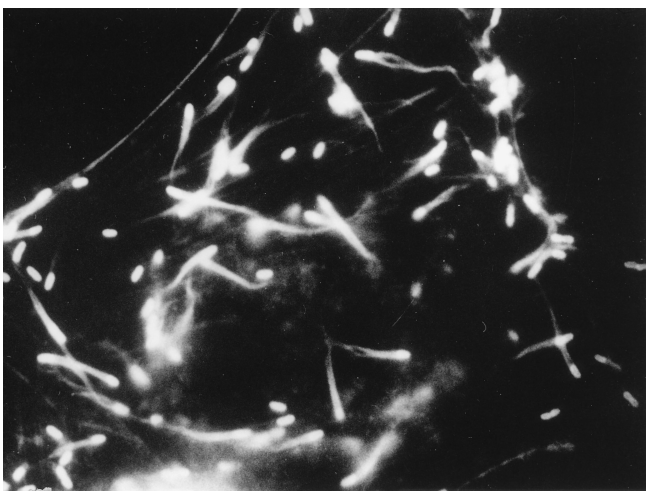
#### **2.3.2.2 Krankheitsbild und Pathogenese**

Die Symptome einer Rickettsiose schließen Fieber, Muskel- und Kopfschmerzen, Hautausschlag, lokale Lymphadenopathie und als Hauptcharakteristikum den sogenannten „tache noir“, eine lokale Nekrose an der Einstichstelle, ein. Die klinische



Manifestation variiert in Abhängigkeit von der *Rickettsia* Spezies, mit welcher der Patient infiziert ist und kann sowohl mild als auch fatal verlaufen. So wird beispielsweise das Japanische Zeckenbissfieber von *R. japonica*, das Afrikanische Zeckenbissfieber von *R. africae*, das Mediterrane Zeckenbissfieber von *R. conorii* und das Rocky-Mountain-Zeckenbissfieber von *R. rickettsii* verursacht (PAROLA et al. 2005a). Die Verbreitung der Erreger ist eng an das Vorkommen und die Aktivität ihrer Reservoirs und Vektoren gebunden. Zum Beispiel sind *Dermacentor* Zecken in Europa vor allem im Frühjahr und im Herbst aktiv und befallen Menschen hauptsächlich am Kopf. Die typischen „tache noir“ am Kopf treten daher meist in diesen Jahreszeiten auf (PAROLA et al. 2005b).

Im Gegensatz zu Anaplasmen werden Rickettsien in der Wirtszelle nicht von Vakuolen eingeschlossen, sondern sitzen frei im Zytoplasma oder im Zellkern. Durch Aktinmobilisation können sich Rickettsien der SFG (Abb. 4), nicht aber der TG, in der Zelle an den Aktinfilamenten entlang bewegen (RAOULT und ROUX 1997). Rickettsien befallen v.a. Endothelzellen kleiner und mittlerer Blutgefäße, vermehren sich dort und verursachen dadurch eine Vaskulitis, die ein klassisches Merkmal einer zeckenassoziierten Rickettsiose ist (PAROLA et al. 2005b). Durch den von Rickettsien induzierten Zelltod bilden sich Nekrosen als pathologisches Korrelat. Des Weiteren entstehen durch die Beschädigung des Gefäßendothels Ödeme und eine Verminderung der zirkulierenden Blutmenge (Hypovolämie), was zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen kann. Das reduzierte Blutvolumen führt zu einer Unterversorgung der verschiedensten Organe und dadurch z.B. zu Fehlfunktionen der Niere und des Gehirns (WALKER et al. 2003).



**Abb. 4 Aktin-basierte Bewegung von *R. conorii* in einer Wirtszelle**

Rickettsien sind mit einem Immunfluoreszenzfarbstoff gefärbt, Aktinfilamente sind mit Phalloidin markiert (aus RAOULT und ROUX, 1997)

### 2.3.2.3 Vektoren, Reservoirwirte und Verbreitung

SFG-Rickettsien sind nahezu weltweit verbreitet. In den verschiedenen Regionen der Erde haben sich die SFG-Rickettsien an unterschiedliche Zeckenarten angepasst. So werden beispielsweise *R. africae* in Afrika von *Amblyomma hebraeum* und *R. parkeri* in den USA von *Amblyomma maculatum* übertragen (PAROLA et al. 2005a). In Europa gelten *I. ricinus*, *Dermacentor reticulatus* und *D. marginatus* als Hauptvektoren bzw. Reservoir für SFG-Rickettsien. Während hier *R. slovaca* und *R. raoultii* ausschließlich von *Dermacentor* spp. und *R. massiliae* hauptsächlich von *Rhipicephalus* spp. übertragen werden (PAROLA et al. 2005b; TALASKA 2009), findet man andere, in Europa vorkommende SFG-Spezies (Tab. 3) meist in *I. ricinus*. Diese Zeckenart gilt hier hauptsächlich als Vektor von *R. helvetica* und *R. monacensis*, seltener auch für die, eigentlich mit *Rhipicephalus* spp. assoziierte Art *R. massiliae* (DOBLER und WÖLFEL 2009).

Bei einigen Spezies, darunter *R. slovaca* (REHACEK 1984), *R. africae* (KELLY und MASON 1991), *R. parkeri* (GODDARD 2003), *R. sibirica* (RUDAKOV et al. 1999), *R. rickettsii* (SCHRIEFER und AZAD 1994) und *R. helvetica* (BURGDORFER et al. 1979), ist transovariable und transstadielle Transmission im Zeckenwirt nachgewiesen, sodass verschiedene Zeckenarten zumindest für diese Spezies ein Reservoir darstellen (Kap. 2.1.1).

Bislang wurden in Europa die (potentiell) humanpathogenen Spezies *R. helvetica*, *R. conorii*, *R. slovaca*, *R. monacensis*, *R. sibirica*, *R. massiliae* und *R. aeschlimannii* nachgewiesen (JADO et al. 2007; PAROLA et al. 2005b; SRETER-LANCZ et al. 2005). Die Prävalenzen dieser Spezies schwanken je nach Untersuchungsgebiet zwischen 0 % in Nordspanien (BARANDIKA et al. 2008), 14,2 % in Brandenburg (PICHON et al. 2006) und 36,6 % in der Toskana (BERTOLOTTI et al. 2006). Eine aktuelle Übersicht der Prävalenzen von SFG-Rickettsien in *I. ricinus* ist in Tab. 3 gegeben.

Die Bedeutung von Vertebraten als Reservoir für Rickettsien wird derzeit noch diskutiert. Nur Wirte, in denen eine stark ausgeprägte und persistierende Rickettsiämie möglich ist, können auch als Reservoir für SFG-Rickettsien agieren (RAOULT und ROUX 1997). Da Rickettsiosen jedoch meist akut und nicht chronisch verlaufen, ist die Rolle von Wirbeltierspezies als Reservoir fraglich, jedoch nicht ausgeschlossen, weil für einige *Rickettsia* spp. keine transovariable Übertragung in der Zecke beobachtet wurde und die Erreger somit andere Reservoir zur Aufrechterhaltung ihres Lebenszyklus nutzen müssen. Das Wissen über potentielle Wirbeltier-Reservoir ist bislang noch gering. In frühen Studien wurde aber angenommen, dass einige Kleinsäuger als Reservoirwirt für *R. rickettsii* in Frage kommen (BURGDORFER et al. 1966), während beispielsweise Hunde oder Baumwollschwanzkaninchen (*Sylvilagus* spp.) keine Rickettsiämie in ausreichendem Maße ausbilden können (BURGDORFER et al. 1980; NORMENT und BURGDORFER 1984). In

Vögeln wurden bereits 1969 verschiedene *Rickettsia* spp. nachgewiesen (CLIFFORD et al. 1969), aber ihre Rolle als Reservoir für SFG-Rickettsien ist bis heute weiterhin unklar. Es wird jedoch vermutet, dass Vögel zumindest für deren Verbreitung von Bedeutung sind (IOANNOU et al. 2009; SANTOS-SILVA et al. 2006).

**Tab. 3 Von *I. ricinus* übertragene SFG-Rickettsien in Europa**

Es werden nur die Prävalenzen in *I. ricinus* dargestellt. Daten von anderen Zeckenarten werden nicht gezeigt. n.i.-Spezies nicht näher klassifiziert, \*-es wurden Pools von Zecken untersucht

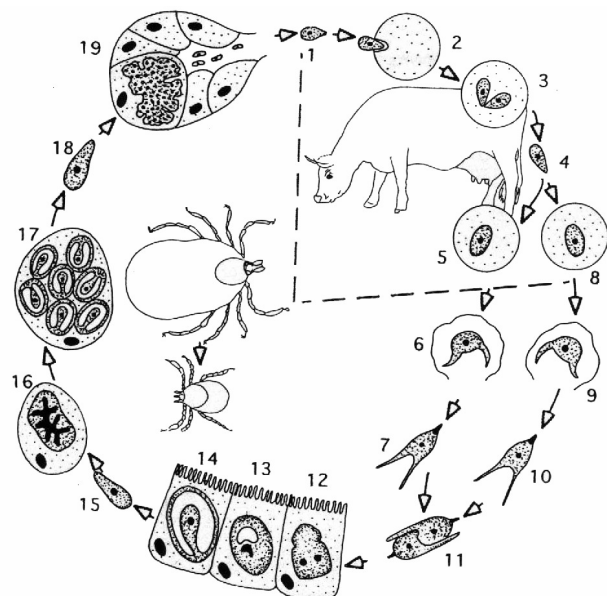
Land (Region)	<i>Rickettsia</i> spp.	Prävalenz (%)	Referenz
Dänemark	<i>R. helvetica</i>	0,9	(SKARPHEDINSSON et al. 2007)
Polen (Norden)	<i>R. helvetica</i>	2,9	(STANCZAK 2006)
Deutschland (Brandenburg)	<i>R. helvetica</i>	14,2	(PICHON et al. 2006)
Deutschland (Bayern)	<i>R. helvetica</i>	3,5 - 12	(DOBLER und WÖLFEL 2009; HARTELT et al. 2004; SILAGHI et al. 2008b; WÖLFEL et al. 2006)
	<i>R. massiliae</i>	1,7	(DOBLER und WÖLFEL 2009)
	<i>R. monacensis</i>	0,5 - 0,6	(DOBLER und WÖLFEL 2009; SILAGHI et al. 2008b)
	n.i.	3,6	(DOBLER und WÖLFEL 2009)
Italien (Norden)	n.i.	1,6	(PICCOLIN et al. 2006)
Italien (Toskana)	<i>R. helvetica</i>	1,5 - 1,9	(BERTOLOTTI et al. 2006)
	n.i.	33,1 - 36,6	
Ungarn	<i>R. helvetica</i>	6,0 - 8,5*	(HORNOK et al. 2009)
	<i>R. monacensis</i>	1,4	
Spanien (Norden)	<i>Rickettsia</i> spp.	0,0	(BARANDIKA et al. 2008)
Spanien (Südosten)	<i>R. helvetica</i>	2,7	(MARQUEZ 2008)
	<i>R. monacensis</i>	9,9	

### 2.3.3 *Babesia* spp.

#### 2.3.3.1 Morphologie und Taxonomie

Bei Babesien handelt es sich um Plasmodien-ähnliche intraerythrozytische Protozoen des Phylums *Apicomplexa* (Ordnung *Piroplasmida*, Familie *Babesiidae*). Sie besitzen apikal angeordnete komplexe Organellen, u.a. lytische Enzyme enthaltende Rhoptrien und für die Adhäsion an Wirtszellen wichtige Mikronemen (HOMER et al. 2000). Babesien sind pleomorph, d.h. sie besitzen je nach Entwicklungsstadium eine unterschiedliche

Morphologie (Abb. 5). Eine eindeutige Identifizierung einzelner Babesienarten oder die Abgrenzung zu anderen Sporozoen (z.B. Plasmodien) nach morphologischen Merkmalen ist daher kaum möglich, sondern nur auf molekularbiologischer Ebene machbar (GRAY et al. 2002). Bis heute wurden mehr als 100 *Babesia* Spezies beschrieben, die mit einer Vielzahl von Säugetier- und Vogelarten assoziiert sind (GRAY und WEISS 2008). Sie wurden anhand morphologischer und genetischer Merkmale in zwei phylogenetische Gruppen eingeteilt: große Babesien, zu denen *Ba. divergens*, *Ba. canis* und *Ba. bovis* gehören und kleine *Babesia* spp., wie zum Beispiel *Ba. microti* und *Ba. gibsoni* (HUNFELD et al. 2008). Neben *Ba. divergens* s.s. und *Ba. microti* s.s. gibt es noch einige sogenannte „*Ba. divergens*- und *Ba. microti*-like“ Spezies, die eine nahe phylogenetische Verwandtschaft zu den beiden Arten aufweisen, aber bislang noch nicht näher charakterisiert wurden (HUNFELD et al. 2008). Zur Vereinfachung werden diese beiden Komplexe in der vorliegenden Arbeit als *Ba. divergens* und *Ba. microti* bezeichnet. Obwohl sie zum gleichen Genus gehören, sind diese beiden Komplexe eher entfernt verwandt, und *Ba. microti* steht vermutlich der Gattung *Theileria* nahe (HOMER et al. 2000). Sieben Arten, bzw. Artenkomplexe sind bislang auch als Humanpathogene in Erscheinung getreten: *Ba. divergens*, *Ba. microti*, *Ba. bovis*, *Ba. canis*, *Ba. duncani*, *Ba. venatorum* (vorläufiger Name, früher EU1) und eine neue, vorläufig als KO1 bezeichnete Art (HUNFELD et al. 2008).



**Abb. 5** Der Entwicklungszyklus von *Babesia* spp.

1-Infektiöser Sporozoit, 2-Invasion in den Erythrozyten, 3-Zweiteilung, 4-Merozoit, 5/8-Gametozyten, 6/9-Gamonten, 7/10-Gameten, 11-Verschmelzung, 12-Zygote, 13/14-Bildung des Kineten in Darmepithelzellen der Zecke, 15-Kinet, 16/17-Vielfachteilungen in Körperzellen mit Bildung weiterer Kineten, 18-Sporokinet, 19-Sporozoitenbildung in der Speicheldrüse. (LUCIUS und LOOS-FRANK 1997)

### 2.3.3.2 Krankheitsbild und Pathogenese

Babesieninfektionen sind hauptsächlich problematisch für immunsupprimierte Patienten, bei denen sie meist lebensbedrohlich verlaufen oder zum Tod führen. Angesichts der steigenden Anzahl an HIV-Infektionen erwartet man daher in den nächsten Jahren auch einen Anstieg der Babesiosen (HUNFELD et al. 2008). Das Spektrum klinischer Manifestationen reicht, je nach Prädisposition und Ausmaß der Parasitämie von subklinischen oder Influenza-ähnlichen bis hin zu fatalen Verläufen. Entsprechend der Vektoraktivität treten die meisten Erkrankungen in den gemäßigten Klimazonen von Mai bis September auf. Symptomatisch kann sich eine Babesiose in allgemeinem Schwächegefühl, Kopf- oder Bauchschmerzen, Arthralgien, hämolytischer Anämie, hohem Fieber, Husten, Hepatosplenomegalie und/oder Nierenversagen äußern (SÜSS et al. 2004). Nach dem Abklingen der Symptome wurden im Tiermodell und beim Menschen asymptomatische Phasen beobachtet, in denen die Erreger über Monate bis Jahre im Wirt persistierten (KRAUSE et al. 1998).

Da Babesien, wie auch Plasmodien, Erythrozyten befallen und diese zerstört werden, ist eine Anämie die logische Folge einer Infektion (HUNFELD et al. 2008). Die genauen Pathomechanismen einer Babesieninfektion sind noch weitgehend unbekannt (HUNFELD et al. 2008). Es gibt Hinweise, dass eine überhöhte Produktion von Entzündungsmediatoren (TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$ ) und damit die Immunreaktion des Wirtes ein pathogener Kofaktor ist (GRAY und WEISS 2008; KRAUSE et al. 2007).

### 2.3.3.3 Vektoren, Reservoirwirte und Verbreitung

Babesien besitzen einen komplexen Entwicklungszyklus, der grob in zwei Phasen eingeteilt werden kann: die erythrozytische Phase mit Merozoitenbildung im Wirbeltierwirt und die sexuelle Entwicklung mit Sporozoitenformation im Zeckenwirt (HOMER et al. 2000). Die unterschiedlichen Entwicklungsstadien sind in Abb. 5 (S. 18) dargestellt.

Die Hauptvektoren für Babesien sind Schildzecken des Genus *Ixodes*, in Europa ist das die ohnehin am häufigsten vorkommende Spezies *I. ricinus*. Andere *Ixodes* Spezies wie *I. trianguliceps* oder *I. muris* spielen zwar auch eine Rolle bei der Verbreitung von Babesien, haben aber keine Bedeutung für den Menschen, da sie ausschließlich Kleinnager befallen (HUNFELD et al. 2008).

Es ist bekannt, dass große Babesien in der Zecke transovariell übertragen werden, kleine, wie *Ba. microti*, jedoch nicht (GRAY und WEISS 2008; HOMER et al. 2000). Unklar ist aber, ob die Dauer der Persistenz in den Zecken ausreicht, um ihnen eine Reservoirfunktion für große Babesien zuzuschreiben (HOMER et al. 2000).

Große und kleine Babesien nutzen unterschiedliche Reservoirwirte, so sind Langschwanzmäuse (*Muridae*) das Hauptreservoir für *Ba. microti*, während große Arten wie *Ba. divergens* hauptsächlich von Rindern auf Zecken übertragen werden (HUNFELD et al. 2008). Verschiedene *Ba. divergens*-like Spezies wie *Ba. venatorum* nutzen daneben auch Rotwild als Reservoir (BONNET et al. 2007; TAMPIERI et al. 2008). Neben Kleinnagern parasitiert *Ba. microti* in einer Vielzahl von Wirtsspezies, darunter Karnivore und Insektivore, deren Reservoirkompetenz aber nicht geklärt ist (GOETHERT und TELFORD 2003). Obwohl bereits verschiedene vogelassozierte Babesien bei Vögeln nachgewiesen wurden (PEIRCE 2005), werden sie bislang jedoch nicht als reservoirkompetent für humanpathogene *Babesia* spp. angesehen (SKOTARCZAK et al. 2006).

Die Prävalenzen von Babesien in wirtssuchenden Zecken in Europa variieren sehr stark in Abhängigkeit vom Untersuchungsgebiet. So wurden beispielsweise in einigen Regionen in Polen gar keine Babesien nachgewiesen (STANCZAK et al. 2004), in anderen dagegen *Ba. microti* in bis zu 13,3 % der Zecken (SKOTARCZAK et al. 2003), während BLASCHITZ et al. (2008) in Österreich *Ba. divergens* in 51,7 % der untersuchten Freilandzecken fanden. Auch in der Schweiz schwanken die Prävalenzen je nach Untersuchungsgebiet von 0,8 % bis 11,0 % (FOPPA et al. 2002). Aktuelle Daten über das Vorkommen humanpathogener *Babesia* spp. in wirtssuchenden *I. ricinus* in Europa sind in Tab. 4 aufgelistet.

Diese große Heterogenität kann viele Ursachen haben. Zum einen beeinflussen mikroklimatische Unterschiede die Aktivität von Zecken und Reservoiren, zum anderen haben verschiedene Zeckenwirte eine unterschiedliche Reservoirkompetenz für bestimmte *Babesia* Spezies. Die Prävalenzen werden also direkt durch das Vorkommen und die Aktivität bestimmter Wirts- bzw. Reservoirspezies beeinflusst. So zeigen beispielsweise verschiedene Langschwanzmaus-Arten eine große Heterogenität in der Prävalenz von *Ba. microti*-Infektionen, woraus sich schließen lässt, dass sie eine unterschiedliche Reservoirkompetenz für diese Spezies besitzen (KARBOWIAK 2004). In Gebieten, in denen überwiegend Arten mit geringer oder gar keiner Reservoirkompetenz vorkommen, sind daher niedrigere *Babesia*-Prävalenzen, v.a. kleiner, nicht transovariell übertragbarer Babesien, zu erwarten. Hinzu kommt, dass auch saisonale Schwankungen in der Zecken- und Wirtsaktivität, wiederum klimatisch bedingt, zu verschiedenen Untersuchungsergebnissen führen können, je nachdem zu welcher Jahreszeit die Proben gesammelt wurden. Genaue Daten über die Saisonalität von Babesienprävalenzen in *I. ricinus* fehlen bislang noch, für *D. reticulatus* wurden klimatisch bedingte saisonale Unterschiede aber bereits festgestellt (LESCHNIK et al. 2008).

**Tab. 4 Von *I. ricinus* übertragene humanpathogene *Babesia* spp. in Europa**

Es werden nur die Prävalenzen in *I. ricinus* dargestellt. Daten von anderen Zeckenarten werden nicht gezeigt. n.i.-Spezies nicht näher klassifiziert, Humanpathogenität daher nicht sicher, \*-es wurden Pools von Zecken untersucht

Land	<i>Babesia</i> spp.	Prävalenz (%)	Referenz
Norwegen	<i>Ba. divergens</i>	0,9	(RADZIJEVSKAJA et al. 2008)
Litauen	<i>Ba. divergens</i>	2,0	(RADZIJEVSKAJA et al. 2008)
Polen	<i>Ba. microti</i>	0,7 - 13,3	(KUZNA-GRYGIEL et al. 2002; SKOTARCZAK und CICHOCKA 2001; SKOTARCZAK et al. 2003; SKOTARCZAK und SAWCZUK 2003; STANCZAK et al. 2004; WOJCIK-FATLA et al. 2006)
Deutschland	<i>Ba. divergens</i>	0,9	(HARTELT et al. 2004)
	<i>Ba. microti</i>	0,1	
Frankreich	n.i.	20,6	(HALOS et al. 2005)
Österreich	<i>Ba. divergens</i>	51,7	(BLASCHITZ et al. 2008)
Tschechische Republik	<i>Ba. microti</i>	~1,5*	(RUDOLF et al. 2005)
Schweiz	<i>Ba. venatorum</i> (EU1)	0,7 - 1,3	(CASATI et al. 2006)
	<i>Ba. microti</i>	0,8 - 11,0*	(FOPPA et al. 2002)
Ungarn	<i>Ba. microti</i>	0,9	(KALMAN et al. 2003)
Slowenien	<i>Ba. microti</i>	7,4	(DUH et al. 2001)
Italien	n.i.	1,6	(PICCOLIN et al. 2006)

## 2.4 Globale Erwärmung und zeckenassoziierte Erkrankungen

In den letzten Jahren wurde beobachtet, dass sich das Verbreitungsgebiet von *I. ricinus* immer weiter in nördliche Regionen ausdehnt. Auch stieg die vertikale Grenze des Vorkommens dieser Art um mehrere hundert Meter (DANIELOVA et al. 2006; GILBERT 2009; MATERNA et al. 2005), und es wurden Änderungen ihrer saisonalen Aktivitätsmuster beobachtet. So wurde beispielsweise in Deutschland und Schweden in letzter Zeit immer öfter eine Zeckenaktivität im Winter festgestellt (BENNET et al. 2006; DAUTEL et al. 2008), während im Sommer geringere Aktivitäten zu beobachten waren (GRAY et al. 2009). Außerdem wurde ein allgemeiner Anstieg der Inzidenzen von zeckenassoziierten Erkrankungen aus vielen Risikoländern Europas gemeldet (SÜSS 2003). Bis vor einigen Jahren lag die nördliche Grenze des Verbreitungsgebietes von *I. ricinus* bei 61°N, mittlerweile hat es sich in Skandinavien auf 66°N ausgedehnt (LINDGREN et al. 2000). Damit einher geht auch eine gestiegene Zahl von zeckenassoziierten Erkrankungen wie

Lyme-Borreliose oder FSME in diesen Gebieten (GRAY et al. 2009). Auch andere Zeckenarten erweitern ihr Verbreitungsgebiet in Europa, z.B. *Dermacentor* spp., wichtige Vektoren für Babesien, Rickettsien und weitere Erreger (DAUTEL et al. 2006; GRAY et al. 2009; SÜSS et al. 2008) oder *Hyalomma marginatum*, der Vektor des gefährlichen Krim-Kongo-hämorrhagischen Fiebers (GRAY et al. 2009). In Frankreich wurde außerdem festgestellt, dass durch eine allgemeine Temperaturerhöhung im Sommer die Affinität von *Rhipicephalus sanguineus*-Zecken, an Menschen zu parasitieren und somit die Gefahr, an ernsthaften Rickettsiosen zu erkranken, steigt (PAROLA et al. 2008). Es liegt nahe, dass all diese Beobachtungen zum Teil in globalen Klimaveränderungen ihre Ursache haben. So können mildere Winter und heiße Sommer in den gemäßigten Breiten zu einer Verschiebung der saisonalen *I. ricinus* Aktivität in spätere Jahresabschnitte führen (GRAY et al. 2009). Die Ursachenfindung gestaltet sich jedoch äußerst schwierig, da eine Vielzahl verschiedener Parameter betrachtet werden muss. Sichere Beweise für einen Einfluss der Globalen Erwärmung auf die Verbreitung zeckenassoziierter Erkrankungen gibt es daher noch nicht, es wird jedoch intensiv auf diesem Gebiet geforscht, denn es sind bereits Trends erkennbar. Es wird angenommen, dass sowohl direkte als auch indirekte Auswirkungen der globalen Erwärmung einen Einfluss auf die Zeckenaktivität haben. Ein Beispiel für eine indirekte Beeinflussung ist die Änderung der Vegetation. So wird erwartet, dass die Gemeine Fichte immer mehr durch Buchen verdrängt wird (KÖLLING 2008). Die höhere Laubschicht führt dann schließlich zu einer Verbesserung der mikroklimatischen Entwicklungsbedingungen für Zecken und somit zu einem Anstieg der Individuenzahl (GRAY et al. 2009).

Eine Transmission zeckenassoziierter Erreger tritt immer dann auf, wenn sich die Aktivitäten von Reservoiren, Vektoren und Menschen überschneiden, und ihre Rate ist abhängig von der Art des Erregers und des Gebietes. Es ist möglich, dass klimatische Veränderungen diese Interaktionen beeinflussen, wenn auch nicht exklusiv (GRAY et al. 2009). Neben der globalen Erwärmung können aber auch andere, politische, gesellschaftliche oder ökonomische Faktoren einen indirekten Einfluss auf die Zunahme zeckenassoziierter Erkrankungen haben, bei denen sich die Datenerhebung/-analyse ähnlich schwierig gestaltet. Hierzu zählen Änderungen des Freizeitverhaltens (Pilzesammeln, Parkaufenthalte, Tourismus etc.), land- und forstwirtschaftliche Veränderungen (z.B. engerer Wirkungsbereich von Pestiziden) oder geringere Umweltverschmutzungen durch bessere ökonomische Bedingungen (SÜSS et al. 2008).



### 3 Eigene Untersuchungen

#### 3.1 Aufgabenstellung

Trotz der immer größer werdenden Bedeutung zeckenassoziiierter Infektionskrankheiten in Europa und auch weltweit, sind die komplexen ökologischen Grundlagen ihrer Lebenszyklen, vor allem in Bezug auf potentielle Reservoirwirte, noch weitgehend unverstanden. Eine genaue Kenntnis dieser Zusammenhänge ist jedoch unabdingbar für die Risikobewertung, das Risikomanagement sowie die Entwicklung geeigneter Schutzmaßnahmen gegen bekannte und neuartige Infektionserreger. Diese Arbeit hatte daher das Ziel, neue Erkenntnisse über die Rolle verschiedener Wirtsspezies und des Vektors *I. ricinus* für die Verbreitung und die Aufrechterhaltung der Transmissionszyklen verschiedener zeckenassoziiierter Erreger zu erlangen. Folgende Fragestellungen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden:

- a.) Welche Rolle spielen ausgewählte Vogelarten im Infektionszyklus und bei der Verbreitung der Pathogene?
- b.) Welche Bedeutung haben in Deutschland häufig vorkommende Kleinsäugerarten als Wirte und Reservoir für verschiedene zeckenassoziierte Erreger?
- c.) Wie hoch ist der Durchseuchungsgrad von *I. ricinus*, v.a. mit den sogenannten „Emerging Pathogens“ in den verschiedenen Untersuchungsgebieten?
- d.) Mit welchen Pathogenspezies und Subtypen sind die Zecken infiziert und wie sind diese mit den Wirtsspezies assoziiert?
- e.) Treten Koinfektionen in *I. ricinus* auf und wenn ja, in welchen Kombinationen?

Dazu sollten, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Zecken unterschiedlicher Herkunft mittels PCR, RFLP und Sequenzanalyse jeweils auf die Präsenz von humanpathogenen Borrelien, Anaplasmen, Rickettsien der Zeckenbissfieber-Gruppe und Babesien untersucht werden. Zudem sollten dabei an Vögeln parasitierende Zecken aus verschiedenen Untersuchungsgebieten molekularbiologisch getestet werden, um Rückschlüsse auf die Reservoir- und Vektorkompetenz verschiedener Vogelarten ziehen zu können. Des Weiteren sollten Zecken, Blutproben und Bioprate von Kleinsäugetieren analysiert werden, um ebenfalls Erkenntnisse über deren Reservoirkompetenz und Infektionsstatus zu gewinnen. Um die Prävalenz der verschiedenen Pathogene in wirtssuchenden Zecken

und somit die Vektorkompetenz von *I. ricinus* zu ermitteln, sollten in verschiedenen Untersuchungsgebieten freilebende *I. ricinus* gesammelt und auf die Anwesenheit von Erregern untersucht werden. Weiterhin sollten in einem Untersuchungsgebiet sowohl Freiland- als auch Kleinsäuger- und Vogelzecken gesammelt und analysiert werden, um Rückschlüsse auf Transmissionsmodi innerhalb eines Habitates ziehen und eventuelle Kenntnislücken über das Reservoirspektrum verschiedener Pathogene aufdecken zu können. Mittels moderner Identifizierungsmethoden wie RFLP oder Sequenzanalyse sollten außerdem positive Proben näher charakterisiert werden, um Assoziationen zwischen Wirtsspezies und einzelnen Pathogenspezies bzw. Subtypen ableiten zu können. Die gewonnenen Daten sollen auch der Risikobewertung in Bezug auf zeckenassoziierte Erkrankungen in den jeweiligen Untersuchungsgebieten dienen.

## 3.2 Material und Methoden

### 3.2.1 Geräte und Chemikalien

In Tab. 5 und Tab. 6 sind alle Geräte bzw. Reagenzien aufgeführt, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden.

**Tab. 5      Verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Firma</b>
Analysenwaage	Sartorius Basic plus	Sartorius, Göttingen
Brutschrank	BE600	Memmert, Schwabach
Dampfsterilisator	Varioklav 400	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Elektrophoresesystem	Savant HG 330	NeoLab, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	Axiolab H350	Carl Zeiss, Jena
Geldokumentationssystem	Fluor-S Multimager	BioRad, München
Genetisches Analysesystem	ABI PRISM 310	Applied Biosystems, Foster City/CA (USA)
Heizrührplatte	Monotherm variomag	H+P Labortechnik, München
Kleinsäugerfallen	Uggla Special No.2	Grahnab, Gnosjö (Schweden)
Mikrowellengerät	MS-1937C	LG Electronics, Willich
pH-Meter	CG840	Schott, Jena
Schüttler	KL-2	Edmund Bühler, Hechingen
Spannungsquelle	EC 250-90	NeoLab, Heidelberg
Spektrophotometer	Nano Drop® ND-1000	PEQLab, Erlangen
Sterile Werkbank	HeraSafe HS12	Heraeus Instruments, Gera
Thermoblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	T48 personal	Biometra, Göttingen
Thermocycler	T3000	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge	Z233	Hermle, Wehlingen
Vortexer	Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	GFL 1008	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge	universal 1200	Hettig, Tuttlingen
Vakuumzentrifuge	DNA Speed vac DNA110	Thermo Savant, Bonn

Tab. 6      Verwendete Chemikalien

Name/Abkürzung	Firma
50 bp Step Ladder (50 µg)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aceton Rotisolv <sup>®</sup> , ≥99,9 %, UV/IR-Grade	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose Gel Extraction Kit	Jena Bioscience, Jena
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Ziege-anti-Maus-IgG F(ab') <sub>2</sub> -Fragm.	Invitrogen, Karlsruhe
<i>A</i> <i>l</i> <i>l</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
AmpliSize <sup>™</sup> Molecular Ruler <sup>™</sup> 50 - 2000 bp Ladder	BioRad, München
aqua bidest. (DEPC behandelt)	Carl Roth, Karlsruhe
<i>B</i> <i>g</i> <i>l</i> <i>I</i> FastDigest <sup>®</sup>	Fermentas, St. Leon-Rot
Borsäure 99,8 %, pulv. (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe
<i>B</i> <i>s</i> <i>p</i> <i>1</i> <i>1</i> <i>9</i> <i>I</i> FastDigest <sup>®</sup>	Fermentas, St. Leon-Rot
Chlorwasserstoffsäure (HCl) 37 %, reinst	Carl Roth, Karlsruhe
Diethylether (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O)	Carl Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat-dodecahydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O)	Carl Roth, Karlsruhe
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
dNTP Mix (10 mM, 200 µl )	Fermentas, St. Leon-Rot
DYEnamic <sup>™</sup> ET Dye terminator Cycle Sequencing Kit	GE Healthcare, München
Ethanol Rotipuran <sup>®</sup> , ≥99 %	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Gel Loading Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Genelute <sup>™</sup> Bacterial Genomic DNA Extraction Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>H</i> <i>i</i> <i>n</i> <i>d</i> <i>I</i> <i>I</i> FastDigest <sup>®</sup>	Fermentas, St. Leon-Rot
Hot-Master <i>Taq</i> -Polymerase	VWR, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe

<i>Kpn2I</i> FastDigest®	Fermentas, St. Leon-Rot
Magnesiumchlorid-hexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )	Carl Roth, Karlsruhe
Meliseptol rapid	B.Braun, Melsungen
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Carl Roth, Karlsruhe
Oligonukleotide	MWG, Ebersberg
<i>SspI</i> FastDigest®	Fermentas, St. Leon-Rot
SYBR Green	Biozym, Hessisch Oldendorf
TaKaRa EX <i>Taq</i> ™	Takara Bio, Ōtsu (Japan)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 99,9 % p.a. (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
<i>XbaI</i> FastDigest®	Fermentas, St. Leon-Rot

### 3.2.1.1 Pufferlösungen

Im folgenden Abschnitt sind alle bei den Analysen verwendeten Pufferansätze aufgelistet. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit HCl (37 %, reinst).

#### Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer pH 8,2 (Masteransatz) :

Für sämtliche Anwendungen wurde der TBE-Puffer 1:10 mit aqua bidest verdünnt.

109 g Tris

55,64 g Borsäure

9,32 g EDTA

aqua bidest. ad 1000 ml

#### modifizierter Phosphate buffered saline (PBS) – Puffer pH 7,2:

8,00 g NaCl

0,20 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,20 g KCl

2,90 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$

1,02 g  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

aqua bidest. ad 1000 ml

Serum – PBS –Puffer pH 7,4:

8,0 g NaCl

0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,2 g KCl

1,15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$

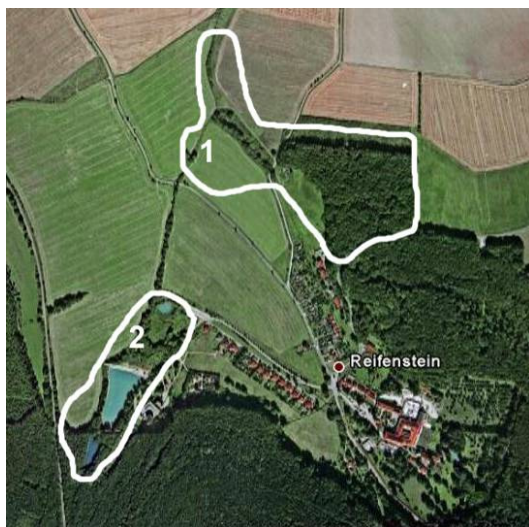
aqua bidest. ad 1.000 ml

### **3.2.2 Untersuchungsgebiete**

Für die Untersuchungen wurden Proben aus verschiedenen Gebieten gewonnen, die im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden. Die Untersuchungsgebiete Reifenstein und Greifswalder Oie wurden ausgewählt, weil dort seit vielen Jahren intensives Vogelmonitoring betrieben wird und nur hier eine Kooperation mit Ornithologen zustande kam.

#### *3.2.2.1 Reifenstein*

Die zur Gemeinde Kleinbartloff gehörende Untersuchungsfläche Reifenstein liegt im Eichsfeld in Nordthüringen. In diesem Gebiet wurden 2 Fangflächen genutzt, in denen Vögel und Kleinsäuger gefangen sowie Freilandzecken gesammelt wurden (Abb. 6). Das strukturreiche Hauptfanggebiet (1) mit einer Größe von ca. 15 ha schließt einen Buchenmischwald, einen Auenwaldrest in Form einer Feuchtwiese, sowie Ackerflächen ein, in deren Mitte sich zwei Klärteiche mit Schilfbewuchs befinden (Abb. 7). Es wird durchzogen von einem Wassergraben.



**Abb. 6 Fangflächen in Reifenstein**

(Gemeinde Kleinbartloff, Eichsfeld/ Thüringen, Foto: Google Earth)

Die ca. 8 ha große Fangfläche 2 befindet sich in der Nähe des Hotels „Reifenstein“. Sie schließt den „Schafsteich“ ein, ein Feuchtbiotop mit Schilf- und Sauergrasbewuchs, einer gut ausgebildeten Kraut- und Strauchschicht sowie einigen Laubbäumen (Abb. 7).



**Abb. 7 Fanggebiet 1 („Klärteich“) und Fangfläche 2 („Schafsteich“) in Reifenstein**

(Quellen: [www.riparia.de](http://www.riparia.de), [www.hotel-reifenstein.de](http://www.hotel-reifenstein.de))

### 3.2.2.2 Greifswalder Oie

Die 54 ha große Greifswalder Oie befindet sich in der Pommerschen Bucht, 12 km nördlich von Usedom. Der öffentliche Zugang zu dieser vom Verein „Jordsand e.V.“ verwalteten Vogelschutzinsel ist streng limitiert. Laubwaldbereiche, halboffene Weideflächen und ausgedehnte Strauchflächen prägen die Landschaft. Die Greifswalder Oie ist ein wichtiges Rastgebiet für viele Zugvogelarten, die Diversität der Säugetierarten ist jedoch sehr gering und besteht im Wesentlichen aus Schafen und Siebenschläfern (*Glis glis*). Aus diesem Grund stellt dieses Gebiet ein außergewöhnliches Zeckenhabitat dar, welches nicht uneingeschränkt mit anderen Untersuchungsgebieten auf dem Festland vergleichbar ist. Im Frühjahr 2007 wurden hier bei regulären Beringungsarbeiten Zeckenproben entnommen und zur Untersuchung an unsere Arbeitsgruppe gesendet.

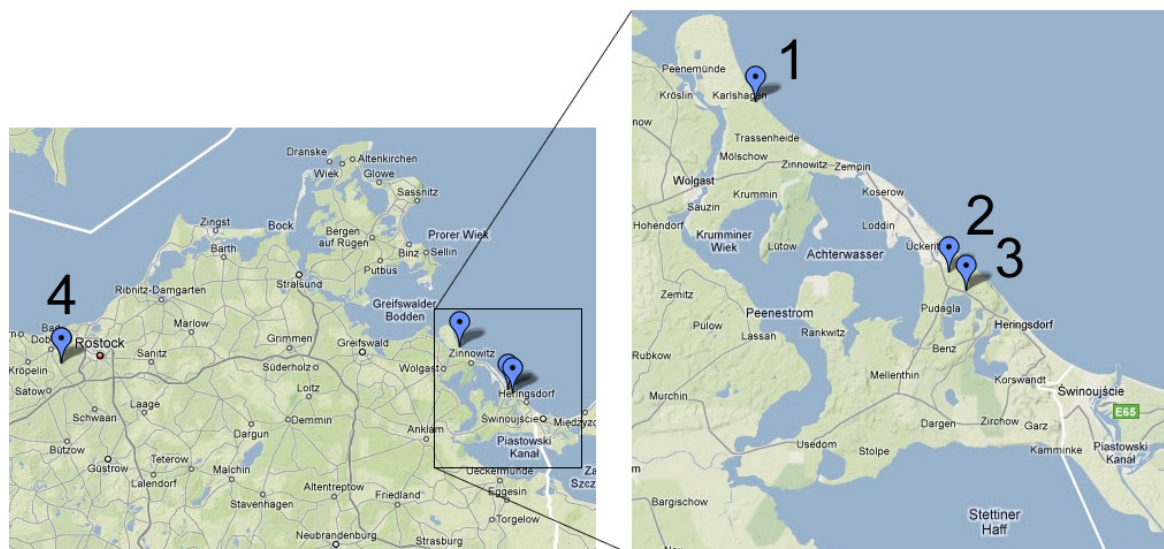


**Abb. 8 Luftansicht der Greifswalder Oie**

(Quelle: WWF Projektbüro Ostsee)

### 3.2.2.3 Weitere Untersuchungsgebiete an der Ostsee

Zur Bestimmung von Erregerprävalenzen in wirtssuchenden *I. ricinus* wurden im Mai und im Juli 2008 in verschiedenen, teils touristisch bedeutsamen Gebieten an der Ostseeküste Freilandzecken gesammelt (Abb. 9). Die Fanggebiete 1-3 befinden sich auf der Insel Usedom. Gebiet 1 liegt in der Nähe des Campingplatzes Karlshagen. Es handelt sich um einen Kiefernforst mit üppiger Strauchschicht, die hauptsächlich durch Farne gebildet wird. Das Gebiet Nr. 2 befindet sich nahe des Zeltplatzes Ückeritz und weist eine ähnliche Vegetation wie Gebiet 1 auf. Fanggebiet 3, ein Buchenmischwald, ebenfalls mit üppigem Farnbewuchs, liegt nahe dem Badeort Bansin. Gebiet Nr. 4 liegt in der Gemeinde Bartenshagen-Parkentin im Hütter Wohld, ca. 12 km westlich von Rostock. Dieser Eichen-Buchen Laubwald beinhaltet das Naturschutzgebiet „Hütter Klosterteiche“.



**Abb. 9** Fanggebiete der Freilandzecken in der Ostseeregion

1-Karlshagen, 2-Ückeritz, 3-Bansin, 4-Hütter Wohld (Karte: Google Maps)

### 3.2.3 Probengewinnung

Um die Bedeutung einzelner Wirtsspezies für die Verbreitung verschiedener zeckenassoziierter Erreger zu untersuchen, wurden Proben von wildlebenden Kleinsäugetern und Vögeln gewonnen. Um sicher zu gehen, dass die Dauer des Saugaktes grundsätzlich für eine Aufnahme von Erregern ausreichend war, wurden von den Wirtstieren nur erkennbar gesogene Zecken untersucht, also solche, bei denen der Hinterleib deutlich vergrößert war (mindestens 1 mm).

Vögel wurden während routinemäßiger Beringungsarbeiten von Ornithologen in den Untersuchungsgebieten Reifenstein (Mai bis Oktober 2007) und Greifswalder Oie (Mai 2007) mit Stellnetzen gefangen. Nach der Artbestimmung und Beringung der Vögel



wurden alle gesogenen *I. ricinus*-Zecken mit einer spitzen Pinzette lebend entnommen (Abb. 10), bei 7 °C gelagert und zum Labor versendet. Bis zur weiteren Analyse wurden die Zecken bei -80 °C im Kälteschrank aufbewahrt.

Kleinsäuger wurden in drei Fangperioden von Juni bis September 2007 im Gebiet Reifenstein mit beköderten Lebendfallen vom Typ Ugglan Special No. 2 (Grahnb, Gnosjö, Schweden) gefangen. Hierzu wurden 100 Fallen ausgelegt und täglich kontrolliert. Gefangene Tiere wurden in einem Glasbehälter mit von Diethylether durchtränktem Zellstoff narkotisiert. Nach Artbestimmung der Nager wurden alle parasitierenden *I. ricinus*-Zecken gezählt und gesogene Exemplare entnommen. Für serologische Untersuchungen wurden im Anschluss mit einer Pasteurpipette aus dem Plexus retrobulbaris hinter dem Augapfel ca. 300 - 500 µl Blut entnommen. Des Weiteren wurde vom Ohr mit einem sterilen Gewebestanzler ein kreisrundes Biopat (d = 4 mm) entnommen. Alle Proben wurden gekühlt zum Labor transportiert und bei -80 °C bis zur weiteren Untersuchung gelagert. Vor dem Einfrieren wurden die Blutproben 30 min bei 10.000 x g zentrifugiert, das Serum im Überstand entnommen und in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Zur Prävalenzbestimmung der verschiedenen Krankheitserreger in wirtssuchenden Zecken wurden in allen Untersuchungsgebieten Freilandzecken gesammelt. Dies geschah mittels Flaggmethode, bei der weiße Baumwolltücher über die unteren Vegetationsschichten gezogen und alle 5 m auf Zecken kontrolliert werden. Da ungesogene Larven aufgrund der geringen Größe und der dadurch zu erwartenden niedrigen DNA-Menge nicht einzeln untersucht werden können, wurden nur Nymphen und Adulti gesammelt.



**Abb. 10** Zeckenentnahme bei einem Rotkehlchen

(Foto: A. Goedecke)

### 3.2.4 DNA-Aufreinigung

Die DNA wurde direkt von den Proben mittels kommerzieller Systeme extrahiert. Da die Auswahl eines geeigneten Extraktionssystems maßgeblich für die nachfolgenden molekularbiologischen Untersuchungen ist, wurden im Vorfeld 10 kommerzielle Extraktionssysteme unterschiedlicher Methoden auf ihre Eignung zur DNA-Extraktion aus Zecken getestet. Die Ergebnisse wurden in einer Diplomarbeit und einem Tagungsbeitrag veröffentlicht (FRANKE 2005; FRANKE und DORN 2007). Nur für das GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) mit einer Sensitivität bis 2 Spirochäten pro 10 µl konnte eine Eignung festgestellt werden, weshalb dieses auch ausschließlich für die vorliegende Arbeit bei der DNA-Extraktion aus Zeckenmaterial verwendet wurde. Es handelt sich hierbei um ein System, bei dem durch den Einsatz von Proteinase K und chaotroper Substanzen Proteine denaturiert und Wasserstoffbrückenbindungen aufgelöst werden. Die DNA bindet dann an eine Silika-Membran und wird nach mehreren Waschschritten von dieser eluiert. Das Herstellerprotokoll wurde wie folgt modifiziert: Vor der chemischen Zelllyse wurden die Zecken mit einem Mikropistill in einem 1,5ml Reaktionsgefäß mechanisch zerkleinert. Um die DNA-Konzentration zu erhöhen, wurde der erste Lysierungsschritt auf 2 h verlängert. Die Eluierung der DNA von der Säule geschah in zwei Schritten mit je 50 µl Elutionslösung was eine Gesamtmenge von 100 µl DNA-Lösung ergab und den Nachweis von allen vier Erregergruppen ermöglichte. Für die Präparation der Bioplate wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) benutzt, welches auf der gleichen Methode beruht. Auch hier wurde die Eluierung, abweichend von den Herstellerangaben, in zwei Schritten mit je 50 µl Elutionspuffer durchgeführt. Zur Sequenzierung positiver Amplikons wurden die betreffenden Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit dem Agarose Gel Extraction Kit (Jena Bioscience, Jena) nach dem Herstellerprotokoll extrahiert.

### 3.2.5 PCR-Nachweismethoden

Für das Screening der DNA-Proben wurden erregerspezifische Genfragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) amplifiziert. Im folgenden Abschnitt werden die Analysen für die einzelnen Erregergruppen beschrieben. Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer können Tab. 9 entnommen werden.

#### 3.2.5.1 *Borrelia* spp. (MICHEL et al. 2003)

Für das Borrelien-Screening wurde eine hemi-nested PCR nach MICHEL et al. (2003) angewendet. Hierbei wird ein 798 - 801 bp langes Fragment des outer-surface-protein A (*ospA*) Gens amplifiziert. Um die Sensitivität zu erhöhen und die genetische Variabilität

dieses Erregerkomplexes abzudecken, werden dabei mit V1a und V1b bzw. V3a und V3b Primerpaare mit jeweils einer Wobble-Position in zwei aufeinander folgenden Reaktionen eingesetzt (Tab. 9, S. 35). Zur Genospezies-Identifikation können durch diese Methode entstandene positive Amplikons der Restriktionsfragment-Längenanalyse unterzogen oder, bei unklaren Resultaten, sequenziert werden (Kap. 3.2.6.2). Der Ansatz wurde nach folgendem Protokoll hergestellt:

**1.PCR:**

HotMaster Taq-Puffer	5 µl
dNTP's (10 mM)	1,25 µl
V1a	0,4 µl
V1b	0,4 µl
R2	0,4 µl
R37	0,4 µl
HotMaster Taq-Polymerase	0,3 µl
aqua bidest. (DEPC beh.)	31,9 µl
DNA	10 µl

**2.(nested) PCR:**

5 µl
1,25 µl
0,4 µl
0,4 µl
0,4 µl
0,4 µl
0,3 µl
36,9 µl
5 µl (aus 1. PCR)

Die Primer lagen in einer Konzentration von 100 pmol/ µl vor. In jeder Reaktion wurde jeweils eine Negativ- (aqua bidest.) und eine Positivkontrolle in Form einer verdünnten DNA-Probe eines kultivierten Borrelienstammes eingesetzt. Die Kulturen wurden im Rahmen einer Promotion von unserer Arbeitsgruppe hergestellt (STEIL 2002). Da oftmals die nested PCR unbefriedigende Resultate in Form verwischter Banden erbrachte, wurde alternativ der Ansatz der ersten PCR, jedoch mit der Primerkombination V3a, V3b, R2 und R37 verwendet. Die Reaktionen wurden unter den in Tab. 7 beschriebenen Bedingungen im Thermocycler durchgeführt.

**Tab. 7      Physikalische Bedingungen für die Amplifikation eines *ospA* Genfragments aus *Borrelia* spp.**

initiale Denaturierung	2 min bei 94 °C	
Denaturierung	20 s bei 94 °C	} 36 Zyklen
Annealing	43 s bei 48 °C	
Elongation	1 min bei 65 °C	
finale Elongation	7 min bei 65 °C	

### 3.2.5.2 Andere Erreger

Der Nachweis von *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. aus Zeckenproben wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Straube durchgeführt. Die Ohrbiopate der Kleinsäuger wurden im Labor unserer Arbeitsgruppe untersucht. Es wurden die selben DNA-Proben wie für das Borrelien-Screening verwendet. Für die Detektion von *A. phagocytophilum* wurde ein 944 bp langes Fragment des 16S rRNA Gens per PCR amplifiziert (HILDEBRANDT et al. 2002). Für Rickettsien wurde das Zitratsynthase Gen *gltA* als „target“ genutzt (NILSSON et al. 1999b). Infektionen mit Babesien wurden durch Amplifikation eines 18S rRNA Fragments nachgewiesen (HARTELT et al. 2004). Die PCR-Ansätze wurden nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

#### Zeckenproben:

PCR-Puffer (TaKaRa)	5 µl
dNTP's (2,5 mM)	4 µl
Primer1	0,5 µl
Primer2	0,5 µl
Taq-Polymerase (TaKaRa)	0,25 µl
aqua bidest. (DEPC beh.)	34,75 µl
DNA	5 µl

#### Biopate:

5 µl (HotMaster)
1 µl (10 mM)
0,5 µl
0,5 µl
0,25 µl (HotMaster)
32,75 µl
10 µl

Die Primerkonzentration lag bei 100 pmol/ µl . Auch hier wurde jeweils eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrollen wurden folgende DNA-Proben eingesetzt: *A. phagocytophilum*, *R. monacensis* (Prof. U. Munderloh, University of Minnesota) und *Ba. microti* bzw. *Ba. divergens* (Prof. U. Mackenstedt, Universität Hohenheim). Je nach Erreger wurden die Reaktionen mit unterschiedlichen physikalischen Bedingungen durchgeführt. Der Thermocycler wurde wie in Tab. 8 beschrieben programmiert.

**Tab. 8      Physikalische Bedingungen der erregerspezifischen PCR**

	<i>A. phagocytophilum</i>		<i>Rickettsia</i> spp.		<i>Babesia</i> spp.
initiale Denaturierung	5 min bei 94 °C		5 min bei 94 °C		2 min bei 94 °C
Denaturierung	30 s bei 94 °C	} 40x	30 s bei 94 °C	} 35x	20 s bei 94 °C
Annealing	30 s bei 56 °C		30 s bei 54 °C		20 s bei 55 °C
Elongation	1.30 min bei 72 °C		1.30 min bei 72 °C		30 s bei 65 °C
finale Elongation	7 min bei 72 °C		7 min bei 72 °C		7 min bei 65 °C

**Tab. 9 Oligonukleotid-Primer und Zielgene der erregerspezifischen PCR**

(for.-forward, rev.-reverse, 1<sup>st</sup>-erste PCR, 2<sup>nd</sup>-zweite PCR, A-Adenin, G-Guanin, C-Cytosin, T-Thymin, R-Adenin oder Guanin)

Erreger	Primer	Sequenz (5' - 3')	Zielgen	Fragmentlänge (bp)
<i>Borrelia</i> spp.	V1a (for., 1 <sup>st</sup> )	GGGAATAGGTCTAATATTAGC	<i>ospA</i>	798 - 801
	V1b (for., 1 <sup>st</sup> )	GGGGATAGGTCTAATATTAGC		
	V3a (for., 2 <sup>nd</sup> )	GCCTTAATAGCATGTAAGC		
	V3b (for., 2 <sup>nd</sup> )	GCCTTAATAGCATGCAAGC		
	R2 (rev., both)	CATAAATTCTCCTTATTTTAAAGC		
	R37 (rev., both)	CCTTATTTTAAAGCGGC		
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Ap16S1f (for.)	CAAGCTTAACACATGCAAGTCGAAC	16S rRNA	944
	Ap16S1r (rev.)	CCCTTCCGTTAAGAAGGATCTAATC		
<i>Rickettsia</i> spp.	RH314 (for.)	AAACAGGTTGCTCATCATTC	<i>gltA</i>	340
	RH654 (rev.)	AGAGCATTTTTTATTATTGG		
<i>Babesia</i> spp.	Bab18Sfor (for.)	TAGRGATTGGAGGTCGTCA	18S rRNA	284
	Bab18Srev (rev.)	AACGGAATTAACCAGACAAA		

### 3.2.6 Speziesdifferenzierung und Verifizierung positiver Proben

#### 3.2.6.1 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus

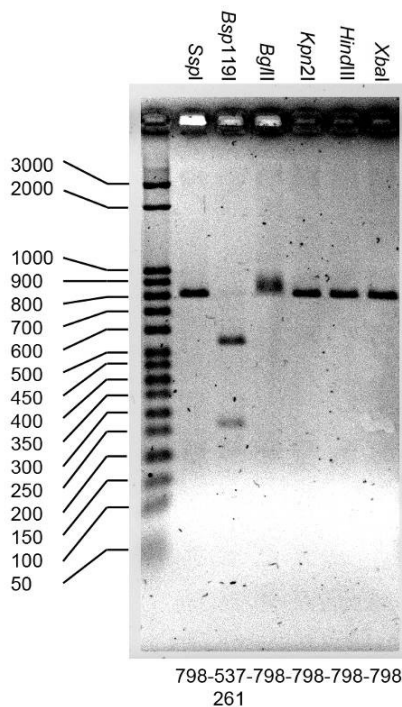
Zur Identifikation von *Borrelia* Genospezies wurde eine Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) auf Basis des *ospA* Gens, modifiziert nach MICHEL et. al (2003), durchgeführt (LENČÁKOVÁ et al. 2006). Dabei wird das positive *ospA* Amplikon mit sechs verschiedenen FastDigest® Restriktionsenzymen in separaten 0,2 ml Reaktionsgefäßen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Auftragen auf ein Agarosegel mit anschließender Elektrophorese können die OspA-Serotypen und somit die Genospezies anhand der spezifischen Bandenmuster identifiziert werden (Tab. 10, Abb. 11).

Bei den anderen Erregern wurde die RFLP Analyse nur angewendet, um die Ergebnisse der PCR zu verifizieren. Die dabei eingesetzten Endonukleasen sowie die entstehenden Fragmentlängen sind in Tab. 11 (S. 37) dargestellt.

**Tab. 10 RFLP Fragmentlängen in Deutschland vorkommender *Borrelia* OspA-Genospezies**

Erweitert und modifiziert nach MICHEL et al. (2003) und LENCAKOVA et al. (2006). Als Restriktionsenzyme wurden FastDigest® Endonukleasen eingesetzt. Statt *SfuI* wurde das Isoschizomer *Bsp119I* verwendet. Fragmentlängen unter 100 bp sind auf dem Agarosegel nicht sichtbar. Es handelt sich dabei um berechnete Werte. (n.-nicht getestet, *B. bur.*-*B. burgdorferi*, *B. afz.*-*B. afzelii*, *B. gar.*-*B. garinii*, *B. bav.*-*B. bavariensis* sp. nov., *B. val.*-*B. valaisiana*, *B. spi.*-*B. spielmanii*)

Stamm	Spezies	OspA Typ	RFLP Muster (bp)					
			<i>Sspl</i>	<i>Bsp119I</i>	<i>BglII</i>	<i>Kpn2I</i>	<i>HindIII</i>	<i>XbaI</i>
PKa2	<i>B. bur.</i>	1	534/264	798	798	798	654/144	n.
CA 8	<i>B. bur.</i>	1	534/264	798	798	429/369	654/144	n.
PKo	<i>B. afz.</i>	2	798	537/261	798	798	798	n.
PBr	<i>B. gar.</i>	3	801	801	758/43	429/372	801	n.
PBi	<i>B. bav.</i>	4	798	798	556/242	798	798	n.
PHei	<i>B. gar.</i>	5	798	798	798	549/195/54	654/144	745/53
TN	<i>B. gar.</i>	6	798	798	798	429/252/120	654/144/72	606/122/73
PRef	<i>B. gar.</i>	7	801	801	758/43	428/372	657/144	n.
PKi	<i>B. gar.</i>	8	798	798	798	429/252/120	654/144/72	725/76
VS116	<i>B. val.</i> Typ I	—	801	801	801	801	465/336	798
NE231	<i>B. val.</i> Typ II	—	798	798	665/133	798	665/133	556/242
A14S	<i>B. spi.</i>	—	798	798	665/133	798	665/133	798



**Abb. 11 Agarosegel mit RFLP Muster eines *ospA*-Amplikons aus einer mit *Borrelien* infizierten *I. ricinus*-Nympe**

Das Bandenmuster lässt auf eine Infektion mit *B. afzelii* (OspA Typ 2) schließen (siehe Tab. 10). oben: Restriktionsenzyme, links: Größenmarker (bp), unten: Fragmentlängen (bp)

Tab. 11 RFLP Fragmentlängen von *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp.

Erreger	Amplikon (bp)	Restriktionsenzym	Fragmentlängen (bp)
<i>A. phagocytophilum</i>	16S rRNA (944)	<i>SspI</i>	633/311
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>gltA</i> (340)	<i>SspI</i>	217/123
<i>Babesia</i> spp.	18S rRNA (283)	<i>AluI</i>	217/66

### 3.2.6.2 Sequenzierung

Im Falle uneindeutiger RFLP- oder PCR-Resultate wurden die aus den erregerspezifischen PCR-Reaktionen gewonnenen Amplikons sequenziert. Sämtliche Sequenzierungsreaktionen wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena in der Arbeitsgruppe von Prof. Straube durchgeführt. Hierzu wurden die betreffenden PCR-Produkte aus dem Agarosegel ausgeschnitten und wie in Kap. 3.2.4 beschrieben präpariert. Für alle Sequenzierungsreaktionen wurde das DYEnamic™ ET Dye terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, München) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Als Primer wurden die in Tab. 9 aufgeführten Oligonukleotide eingesetzt. Es folgte die Präparation der Proben für die automatisierte genetische Analyse mittels Kapillarelektrophorese im ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City/CA, USA) nach dem Herstellerprotokoll. Nicht alle *Rickettsia* spp. positiven Proben wurden per Sequenzierung genauer klassifiziert. Das Hauptinteresse lag hier in der Verifizierung schwach positiver Proben, mit denen eine RFLP nicht möglich war. Bei *Babesia* spp. Amplikons wurden in dieser Studie nur die beiden Gruppen der *Ba. divergens*- und *Ba. microti*-like Spezies differenziert. Zur Vereinfachung werden diese Komplexe jedoch als *Ba. divergens* und *Ba. microti* bezeichnet. Auf die phylogenetische Analyse der Sequenzen wird in Kap. 3.2.8.2 genauer eingegangen.

### 3.2.7 Serologie

Für die Untersuchung des Immunstatus wurden die Kleinsäugerseren auf Anti-Borrelien-IgG mittels Immunfluoreszenztest (IFT) untersucht. Dafür wurden zunächst Teflon-Objektträger (Carl Roth, Karlsruhe) mit 10 µl *B. afzelii* Kultur pro Feld beschichtet. Die Kulturen wurden vorher abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml PBS Puffer gelöst. Die Verdünnung wurde so eingestellt, dass 10 - 15 Spirochäten pro Gesichtsfeld unter dem Mikroskop zu sehen sind. Die Objektträger wurden anschließend bei 37 °C im Brutschrank getrocknet und im Acetonbad für 10 min bei -20 °C fixiert. Anschließend erfolgte die Verdünnung der Seren in Serum - PBS auf 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 und 1:1024 in einer Mikrotiterplatte. Die Verdünnungsstufen wurden auf die antigen-

beschichteten Felder aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C in der feuchten Kammer wurden die Objektträger zweimal 5 min in PBS sowie einmal 5 min in aqua bidest. gewaschen und anschließend getrocknet. Es folgte die Zugabe von 10 µl eines Alexa Fluor® 488-konjugierten F(ab')<sub>2</sub>-Fragments eines Ziege-anti-Maus IgG (1:125, Invitrogen, Karlsruhe). Die Inkubations- und Waschschrte wurden unter Lichtausschluss wiederholt, gefolgt von der Bestimmung der Antikörpertiter unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 488nm. Als Titer galt die höchste Verdünnungsstufe, bei der noch fluoreszierende Spirochäten sichtbar waren, wobei ein Titer von 1:8 als Schwellenwert galt, sodass alle Proben mit einem Titer über 1:16 als seropositiv bewertet wurden. Als Kontrolle wurden PBS, Negativserum und Positivserum eingesetzt.

### 3.2.8 Auswertungsmethoden

#### 3.2.8.1 Geldokumentation

PCR- und Restriktionsprodukte wurden in einem 2 %-igem Agarose Gel in TBE bei 85 mV elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden je 7 µl DNA - Probe mit 3 µl Gel Loading Solution (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) vermischt und aufgetragen. Zur Skalierung der Fragmentgrößen diente die 50 bp Step Ladder (Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Die Banden wurden in einer Ethidiumbromidlösung angefärbt, unter UV-Bestrahlung zur Fluoreszenz angeregt und mit einem Fluor-S-Multimager System (Bio-Rad, München) fotografiert. Bei Banden, die nur schwach zu erkennen waren wurden die Fotos mit Photoshop® CS2 (Adobe Systems, München) zur Kontrastverstärkung am PC bearbeitet.

#### 3.2.8.2 Sequenzanalyse

Um zu überprüfen, ob die Amplikons einer der vier Erregergruppen zugeordnet werden können, wurden alle Sequenzen mit der NCBI Datenbank verglichen. Ergab der Datenbankabgleich ein positives Ergebnis für *Borrelia* spp., wurden genaue Sequenzvergleiche in Form eines „multiple alignments“ mit der Software ClustalX unter folgenden Parametern durchgeführt: gap opening = mind. 15; gap extension = 0.5; delay divergent sequences = 60 %; DNA transition weight = 0.5 (THOMPSON et al. 1997).

Als Referenzstränge wurden dazu *ospA* Sequenzen ausgewählter europäischer *Borrelia* Stämme verwendet, die der NCBI Datenbank entnommen wurden (siehe Anhang, S. XVII). Als „outgroup“ wurde die *ospA* Sequenz des *B. lusitaniae* Stammes PotiB2 genutzt, der nur im Mittelmeerraum vorkommt. Da das *ospA* Gen nur bei Vertretern des früher als *B. burgdorferi* sensu lato bezeichneten Komplexes, nicht aber bei anderen



Borrelia vorkommt, war dies die einzige Möglichkeit, das entstehende Baumdiagramm mit einer entfernt verwandten Spezies („outgroup“) zu „rooten“.

Mit ClustalX wurden anschließend sogenannte „Bootstrap“-Bäume erzeugt. Es handelt sich hierbei um ein komplexes statistisches Verfahren, bei dem computergeneriert die Spalten (Positionen) eines Alignments in unterschiedlicher Abfolge zusammengestellt und manche Nukleotidpositionen nicht berücksichtigt werden, andere dafür mehrfach. Mit dieser Methode ist es möglich, Wahrscheinlichkeiten in Form eines Konsensusbaumes mit Bootstrap-Werten für bestimmte phylogenetische Beziehungen zu erhalten. Für die vorliegende Arbeit wurde das Bootstrap Alignment mit 10.000 Durchgängen unterschiedlicher Kombinationen durchgeführt. Die Daten wurden dann mit der TreeView Software (Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, UK) visualisiert. Die Bootstrap Werte an den Knotenpunkten bezeichnen die Anzahl der Durchgänge, bei denen die jeweilige Kombination im Bootstrap-Verfahren aufgetreten ist. Werte über 50 %, in diesem Fall also 5.000, gelten als signifikant.

### 3.2.8.3 Statistik

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Grafiken wurden mit MS Excel 2003 (Microsoft®, Unterschleißheim, Deutschland), PASW® Statistics 18 (SPSS®, Chicago/IL, USA) und Origin® 6.0 (Microcal™, Northampton/MA, USA) durchgeführt.

Bei intervallskalierten Werten (z.B. Infestationsraten, Antikörpertiter) wurde für den Vergleich zweier Mittelwerte unanhängiger Stichproben ein unverbundener t-Test auf einer Signifikanzebene von  $\alpha = 0,05$  durchgeführt. Als signifikant verschieden gelten demnach zwei Mittelwerte, wenn die errechnete Wahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  ist. Die Antikörpertiter wurden für statistische Berechnungen in reziproke Werte konvertiert (z.B. 1:256 = 256). Um Erregerprävalenzen zu vergleichen, wurden bei einer Stichprobenzahl von  $n \geq 60$  der Chi-Quadrat ( $\chi^2$ ) Test nach Pearson (bei Stichproben zwischen 20 und 60 mit Yates-Kontinuitätskorrektur) verwendet. Bei kleineren Stichproben bzw. für den Vergleich von nur zwei Gruppen kam Fisher's Exakter Test zur Anwendung. Die Daten wurden hierzu in Kreuztabellen aufgelistet. Auch für diese Tests galt ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$ . Zur Untersuchung der Korrelation zwischen Infestation und Antikörpertitern wurde eine lineare Regression durchgeführt. Die Variablen  $a$  und  $b$  der Regressionsgerade  $y = a + bx_i$  wurden mittels der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt. Als Maßzahl für die Güte der Regression wurde das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  verwendet, wobei ein linearer Zusammenhang um so wahrscheinlicher ist, je näher  $R^2$  an 1 liegt. Ist  $R^2$  dagegen nahe 0, besteht mit großer Wahrscheinlichkeit kein Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Fangzahlen und Gesamtprävalenzen

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 1383 *I. ricinus*-Zecken auf die Anwesenheit von Erregern untersucht. Davon stammen 402 Zecken von Vögeln und 273 von Kleinsäugetieren. 708 wirtssuchende Zecken wurden im Freiland gesammelt. In den Untersuchungsgebieten Greifswalder Oie und Reifenstein wurden zusammen 160 Vögel gefangen, die 17 verschiedenen Arten zugeordnet werden konnten. Für die Untersuchung der Kleinsäugetiere wurden in Reifenstein 207 Tiere gefangen, die mit insgesamt 627 Zecken infiziert waren. 357 Larven von Kleinsäugetieren konnten aufgrund des geringen Saugzustandes (Hinterleib unter 1 mm dick) nicht untersucht werden. Insgesamt waren 248 Zecken (17,9 %) mit mindestens einer der untersuchten Pathogenspezies infiziert. Für die an Kleinsäugetieren parasitierenden Zecken lag dieser Wert bei 11,4 % (31/273) und für wirtssuchende Zecken<sup>1</sup> bei 19,2 % (94/489). Zecken von Vögeln waren zu 26,1 % (105/402) mit mindestens einer Erregerart infiziert. Borrelien wurden insgesamt in 6,7 % der untersuchten Zecken nachgewiesen. Zusammengefasst wurden in 1,5 % aller untersuchter Zecken Anaplasmen, in 4,8 % Rickettsien und in 8,6 % Babesien gefunden. Die Erregerprävalenzen von Zecken verschiedenen Ursprungs sowie aufgetretene Koinfektionen werden im folgenden Abschnitt im Detail aufgezeigt.

### 4.2 Zecken von Vögeln

#### 4.2.1 Infestation

Bei den 17 gefangenen Vogelarten handelt es sich ausschließlich um bodenlebende oder teilweise bodenlebende Sperlingsvögel (Ordnung *Passeriformes*), die, bis auf die Kohlmeise (*Parus major*), als Zugvögel oder Teilzieher gelten. Die mittlere Infestation der 160 untersuchten Vögel lag bei 2,5 Zecken pro Vogel. Vögel aus Reifenstein (mittl. Inf. = 3,5) waren signifikant häufiger befallen als Vögel von der Greifswalder Oie (mittl. Inf. = 2,0;  $p = 0,00008$ ). Hierzu sei erwähnt, dass für die vorliegende Arbeit nur Vögel mit parasitierenden Zecken untersucht wurden, weshalb die tatsächliche mittlere Infestation in beiden Gebieten niedriger als der ermittelte Wert ist.

Der Hauptteil der 402 entnommenen Zecken bestand aus Nymphen (277), daneben wurden 124 Larven und ein adultes Weibchen gefunden. Amseln (*Turdus merula*,  $\varnothing$  3,6),

---

<sup>1</sup> Es wurden nur Freilandzecken einbezogen, die auf alle 4 Erregergruppen getestet wurden (siehe Tab. 21, S. 56).

Singdrosseln ( $\emptyset$  3,9) und Rotdrosseln ( $\emptyset$  2,5) waren deutlich häufiger mit *I. ricinus* befallen als Rotkehlchen ( $\emptyset$  1,6;  $p \leq 0,0002$ ). Da von 13 Arten nur wenige Individuen gefangen wurden (Tab. 12), können keine statistisch relevanten Aussagen über die Infestation dieser Spezies getroffen werden.

**Tab. 12 Individuenzahlen und Infestation der in Reifenstein und auf der Greifswalder Oie gefangenen Vogelarten mit *I. ricinus*-Zecken**

Da nur ein Vogel mit einem adulten *I. ricinus* Weibchen infestiert war, sind hier nur Larven (La) und Nymphen (Ny) aufgelistet. <sup>R</sup>-Art wurde nur in Reifenstein gefangen, <sup>G</sup>-Art wurde nur auf der Greifswalder Oie gefangen, \*-Individuenzahl (N) zu gering für statistische Analysen, n.z.-Art nicht mehr zuordenbar, da Daten vom Beringer nicht zur Verfügung gestellt werden konnten

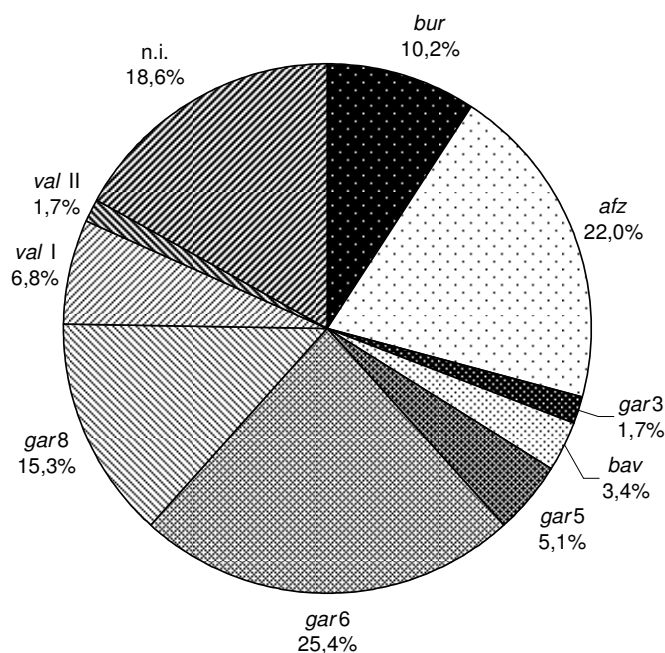
Art	wissenschaftlicher Name	N	Infestation			
			La	Ny	Gesamt	$\emptyset$
Amsel	<i>Turdus merula</i>	35	38	87	125	3,6
Blaumeise <sup>R</sup>	<i>Cyanistes caeruleus</i>	1	0	1	1	*
Buchfink <sup>G</sup>	<i>Fringilla coelebs</i>	1	3	0	3	*
Dorngrasmücke <sup>G</sup>	<i>Sylvia communis</i>	1	0	1	1	*
Gartenrotschwanz <sup>G</sup>	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	2	1	1	2	*
Gimpel <sup>R</sup>	<i>Pyrrhula pyrrhula</i>	3	3	3	6	*
Heckenbraunelle <sup>R</sup>	<i>Prunella modularis</i>	2	1	5	6	*
Kohlmeise	<i>Parus major</i>	5	9	9	19	*
Mönchsgasmücke <sup>R</sup>	<i>Sylvia atricapilla</i>	1	0	1	1	*
Rotdrossel <sup>G</sup>	<i>Turdus iliacus</i>	19	4	44	48	2,5
Rotkehlchen	<i>Erithacus rubecula</i>	56	43	48	91	1,6
Singdrossel	<i>Turdus philomelos</i>	17	16	51	67	3,9
Sprosser <sup>G</sup>	<i>Luscinia luscinia</i>	3	2	4	6	*
Sumpfrohrsänger	<i>Acrocephalus palustris</i>	2	2	1	3	*
Teichrohrsänger <sup>R</sup>	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	1	0	1	1	*
Zaunkönig	<i>Troglodytes troglodytes</i>	4	1	3	4	*
Zilpzalp <sup>R</sup>	<i>Phylloscopus collybita</i>	1	0	1	1	*
n.z. <sup>R</sup>	n.z.	6	1	16	17	*
<b>Gesamt</b>		<b>160</b>	<b>124</b>	<b>277</b>	<b>402</b>	<b>2,5</b>

#### 4.2.2 Infektionen mit Borrelien

Borrelien-DNA wurde in 59 von 402 untersuchten Zecken nachgewiesen (14,7 %). Die Prävalenz bei parasitierenden Larven (20,2 %) war signifikant höher als bei Nymphen (12,3 %,  $p = 0,026$ ). Zwischen den beiden Untersuchungsgebieten konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Gesamtprävalenz von Borrelien festgestellt werden.

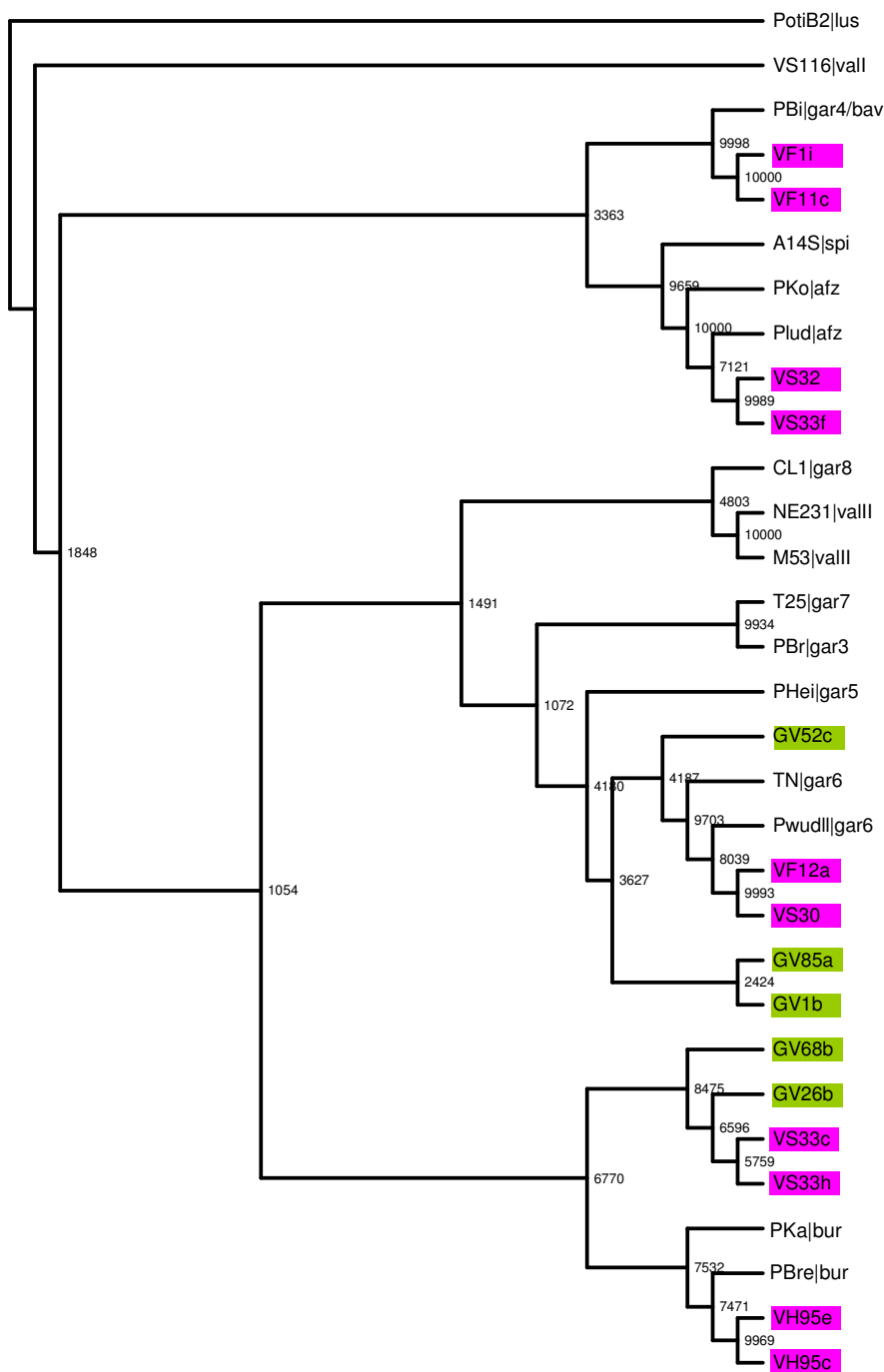
23,8 % der Vögel waren jeweils mit mindestens einer *Borrelia*-positiven Zecke infestiert. Dabei waren deutlich mehr Amseln (40,0 %) mit Borrelien-infizierten Zecken befallen als Rotkehlchen (14,3 %,  $p = 0,006$ ). Sonst zeigten sich zwischen den Vogelarten mit statistisch relevanten Individuenzahlen keine wesentlichen Differenzen. Auch hier wurden keine Unterschiede zwischen den Untersuchungsgebieten festgestellt.

Am häufigsten wurde *B. garinii* OspA Typ 6 in Vogelzecken nachgewiesen (25,4 % der Positiven, Abb. 12). Andere vogelassoziierte Genotypen wie *B. valaisiana* Typ I und II (6,8 % und 1,7 %) oder die *B. garinii* OspA Typen 3 (1,7 %), 5 (5,1 %) und 8 (15,3 %) wurden seltener nachgewiesen. Ungewöhnlich war der hohe Anteil (22,0 %) der kleinsäugerassoziierten Spezies *B. afzelii* (OspA Typ 2) als zweithäufigste nachgewiesene Art. *Borrelia bavariensis* (OspA Typ 4), ebenfalls kleinsäugerassoziiert, wurde dagegen in nur 3,4 % der Positiven gefunden. Die von beiden Reservoirgruppen übertragene Art *B. burgdorferi* wurde in 10,2 % der positiven Vogelzecken identifiziert. Ein relativ hoher Anteil von 18,6 % der Borrelieninfektionen konnte aufgrund zu geringer Mengen an PCR-Produkt oder zu kurzer Fragmentlängen für die Sequenzanalyse nicht näher charakterisiert werden (Abb. 12).



**Abb. 12** Spektrum der *Borrelia*-Genospezies in infizierten *I. ricinus*-Zecken, die an Vögeln parasitierten

Proben aus Reifenstein und von der Greifswalder Oie wurden zusammengefasst. Die prozentualen Werte beziehen sich auf die Gesamtzahl von 59 positiven Proben. Da 4 Zecken jeweils mit mehreren Genospezies koinfiziert waren, ist die Summe größer als 100 %. bur–*B. burgdorferi*, afz–*B. afzelii*, bav–*B. bavariensis*, gar3 bis gar8–*B. garinii* (OspA Typen 3-8), val I und II–*B. valaisiana* (Subtypen I und II), n.i.–Genospezies nicht identifizierbar



**Abb. 13** Phylogenetische Analyse der sequenzierten *osp4*-Fragmente aus an Vögeln parasitierenden Zecken

Es sind nur die sequenzierten Proben dargestellt, bei denen eine eindeutige Klassifizierung möglich war. Die Referenzstränge (Stamm|Genospezies) wurden der NCBI-Datenbank entnommen (siehe Anhang, S. XVII). Als „outgroup“ wurde *B. lusitaniae* (Stamm PotiB2) verwendet. Die Bootstrap-Werte bezeichnen die Wahrscheinlichkeit, mit der eine bestimmte Verzweigung beim Alignment eintritt (Kap. 3.2.8.2, S. 38). Es fällt auf, dass einige Werte nicht im signifikanten Bereich liegen. Einzelanalysen der jeweiligen Proben im Vergleich mit den selben Referenzstämmen und der Abgleich mit der NCBI-Datenbank bestätigten aber die Resultate. Aus Platzgründen werden diese Baumdiagramme nicht gezeigt und alle Proben wurden in einem Kladogramm zusammengefasst. Proben aus Reifenstein sind violett, Proben von der Greifswalder Oie grün unterlegt. bur–*B. burgdorferi*, afz–*B. afzelii*, gar4/bav–*B. bavariensis*, gar3 bis gar8–*B. garinii* (OspA Typen 3-8), val I und II–*B. valaisiana* (Subtypen I und II), lus–*B. lusitaniae*, spi–*B. spielmanii*

Ein Chi-Quadrat Test ergab keine signifikanten Unterschiede in der Genospezieszusammensetzung zwischen Larven und Nymphen ( $p = 0,8$ ). Die Verteilung der Genospezies auf die beiden subadulten Zeckenstadien ist in Abb. 14 (S. 45) dargestellt. Daneben wurde festgestellt, dass die Zusammensetzung des *Borrelia*-Artenspektrums abhängig von der Vogelart ist, von welcher die infizierten Zecken entnommen wurden ( $p = 0,019$ ). Zecken von Amseln zeigten generell das breiteste Spektrum. Hier wurden acht verschiedene *Borrelia*-Genospezies nachgewiesen, bei Zecken von Singdrosseln dagegen nur vier, von Rotkehlchen drei und Rotdrosseln zwei (Tab. 13). *Borrelia afzelii* wurde am häufigsten in an Rotdrosseln (8,3 %) und Rotkehlchen (6,6 %) parasitierenden Zecken gefunden, dagegen traten typische vogelassoziierte Spezies wie *B. garinii* am häufigsten, *B. valaisiana* sogar ausschließlich in Zecken von Amseln auf (Tab. 13).

Aufgrund der geringen Anzahl an infizierten Larven bei Singdrosseln, Rotdrosseln und Rotkehlchen, konnte der Chi-Quadrat-Test in Bezug auf das Artenspektrum von Borrelien nicht separat für Larven durchgeführt werden. Einzelvergleiche mit Fisher's Exaktem Test ergaben aber, dass signifikant mehr Larven von Amseln (15,8 %) mit *B. garinii* OspA Typ6 infiziert waren als Larven von Rotkehlchen (2,3 %,  $p = 0,037$ ). Bei anderen Genospezies konnten für die Prävalenz in Larven wegen der stark unterschiedlichen Infestation mit diesem Zeckenstadium keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Vogelarten festgestellt werden.

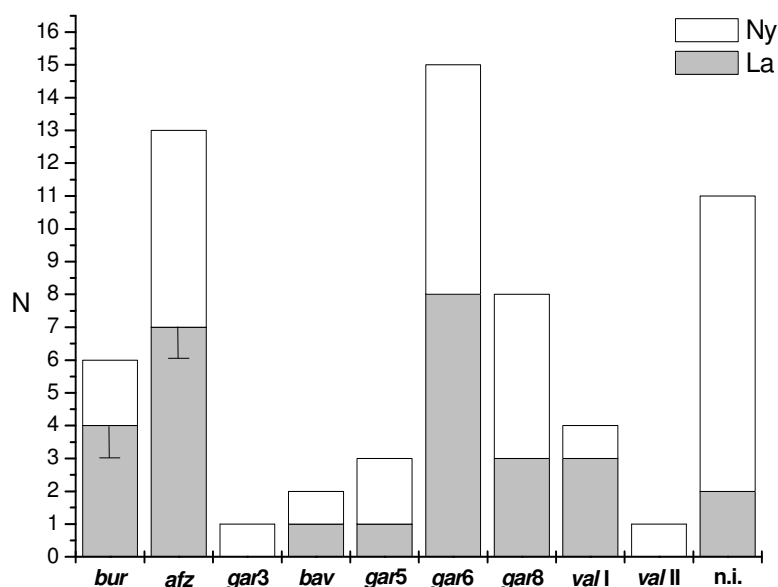
**Tab. 13 Prävalenzen von *Borrelia*-Genospezies in Zecken ausgewählter Vogelarten**

Es wurden sind nur Vogelarten mit statistisch relevanten Infestationszahlen verglichen. Die obere Zeile enthält jeweils die prozentualen Gesamtprävalenzen (Prävalenzen der Larven in Klammern). \*-Prävalenz wurde nicht berechnet, da nur 4 Larven parasitierten. *bur*–*B. burgdorferi*, *afz*–*B. afzelii*, *bav*–*B. bavariensis*, *gar3* bis *gar8*–*B. garinii* (OspA Typen 3-8), *val I* und *val II*–*B. valaisiana* (Subtypen I und II)

Vogelart	<i>bur</i>	<i>afz</i>	<i>gar3</i>	<i>bav</i>	<i>gar5</i>	<i>gar6</i>	<i>gar8</i>	<i>val I</i>	<i>val II</i>	n.i.	Gesamt
Amsel	1,6 (5,3)	1,6 (2,6)		1,6 (2,6)	2,4 (2,6)	9,6 (15,8)	4,8 (5,3)	3,2 (7,9)	0,8 (0,0)	0,8 (0,0)	21,6 (34,2)
Singdrossel	3,0 (6,3)	1,5 (6,3)	1,5 (0,0)			3,0 (0,0)					9,0 (12,5)
Rotkehlchen	1,1 (2,3)	6,6 (9,3)				2,2 (2,3)				2,2 (4,7)	18,6 (12,1)
Rotdrossel	2,1 (*)	8,3 (*)								4,5 (*)	16,7 (*)

Sieben der insgesamt 13 *B. afzelii*-infizierten Vogelzecken waren Larven. An einem Rotkehlchen waren zwei Larven mit *B. afzelii* und eine Nymphe mit *B. garinii* OspA Typ 6 infiziert. An einer Singdrossel mit einer *B. afzelii*-infizierten Larve saugten gleichzeitig eine

Larve und eine Nymphe mit einer *B. burgdorferi*-Infektion. An keinem der Vögel mit *B. afzelii*-positiven Larven parasitierten Nymphen, die ebenfalls mit *B. afzelii* infiziert waren. Nur an einer Amsel saugte gleichzeitig eine mit einem nicht identifizierbaren Borrelienstamm infizierte Nymphe (siehe Fehlerbalken in Abb. 14). Ein Chi-Quadrat Test ergab signifikante Unterschiede in der Genospezieszusammensetzung zwischen den beiden Untersuchungsgebieten ( $p = 0,0034$ ). Der Großteil der mit *B. afzelii* infizierten Vogelzecken stammt von der Greifswalder Oie (11/13). In Reifenstein trugen nur eine Singdrossel (1 La) und eine Amsel (1 Ny) Zecken, die mit dieser Genospezies infiziert waren. Während hier aber alle neun in Tab. 13 aufgelisteten OspA-Typen in Vogelzecken auftraten, wurden auf der Greifswalder Oie nur *B. burgdorferi*, *B. afzelii*, und die *B. garinii* OspA Typen 6 und 8 nachgewiesen.



**Abb. 14** Verteilung der *Borrelia*-Genospezies bei an Vögeln parasitierenden Larven und Nymphen

Die Untersuchungsgebiete Reifenstein und Greifswalder Oie wurden zusammengefasst. Der Fehlerbalken indiziert die Anzahl positiver Larven, bei denen Cofeeding als Ursache der Infektion nicht ausgeschlossen werden kann, d.h. Larven von Vögeln, an denen weitere Nymphen parasitierten, die mit der gleichen oder einer nicht identifizierten Genospezies infiziert waren. N–Individuenzahl, La–Larven, Ny–Nymphen, bur–*B. burgdorferi*, afz–*B. afzelii*, bav–*B. bavariensis*, gar3 bis gar8–*B. garinii* (OspA Typen 3–8), val I und II–*B. valaisiana* (Subtypen I und II), n.i. –Genospezies nicht identifizierbar

Bei fünf Zecken (1,2 %) von vier Vögeln (2,5 %) traten Koinfektionen mit verschiedenen *Borrelia* Spezies auf. Eine Larve von einer Amsel war mit drei verschiedenen Genospezies infiziert (Tab. 14). Die Saisonalität konnte nur bei den Daten aus Reifenstein untersucht werden, da auf der Greifswalder Oie nur im Frühjahr Proben gesammelt werden konnten. Die Gesamtprävalenz von Borrelieninfektionen in Vogelzecken änderte sich nur unwesentlich von 17,5 % im Frühjahr über 12,0 % im Sommer auf 15,2 % im

Herbst. Der prozentuale Anteil von Vögeln, an denen *Borrelia*-positive Zecken saßen, sank zwar im Jahresverlauf stark von 50,0 % im Frühjahr über 23,1 % im Sommer auf 6,7 % im Herbst, jedoch ist diese Entwicklung aufgrund der geringen Individuenzahlen nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

**Tab. 14 Koinfektionen mit *Borrelia*-Genospezies in von Vögeln abgesammelten Zecken**

In Spalte 5 sind alle weiteren Zecken aufgelistet, die an dem jeweiligen Vogel parasitierten. GV–Greifswalder Oie, VF und VS–Reifenstein (Frühjahr und Sommer), neg.–negativ, La–Larven, Ny–Nymphen, *gar*5,6 und 8–*B. garinii* OspA Typen 5, 6 und 8, *val* I–*B. valaisiana* Subtyp I, \*–Larven stammen vom selben Vogel

Zecke Nr.	Vogelart	Zeckenstadium	Genospezies	weitere Zecken
GV97b	Singdrossel	Ny	<i>gar</i> 6 + <i>gar</i> 8	2 Ny (neg.)
VF24b	Amsel	Ny	<i>gar</i> 5 + <i>gar</i> 6	2 Ny ( <i>gar</i> 5)
VS27b	Amsel	Ny	<i>val</i> I + <i>gar</i> 6	3 Ny ( <i>gar</i> 8), 1 Ny (neg)
VS40a*	Amsel	La	<i>val</i> I + <i>gar</i> 6 + <i>gar</i> 8	-
VS40b*	Amsel	La	<i>val</i> I + <i>gar</i> 8	-

#### 4.2.3 Infektionen mit Anaplasmen und Rickettsien

Bei 11 Zecken (2,7 %) wurde *Anaplasma phagocytophilum* nachgewiesen. Neun positive Proben traten bei Nymphen (3,2 %) und zwei bei Larven auf (1,6 %, Tab. 15). Acht Vögel (5,0 %, 2 Amseln, 2 Rotdrosseln, 4 Rotkehlchen) waren mit *Anaplasma*-infizierten Zecken infestiert. Jeweils die Hälfte dieser Vögel stammte von der Greifswalder Oie bzw. aus Reifenstein. An einem Rotkehlchen parasitierte eine einzelne Larve, die mit *A. phagocytophilum* infiziert war. Eine Amsel war mit einer infizierten Larve und einer positiven Nymphe infestiert, eine Rotdrossel und ein Rotkehlchen trugen jeweils zwei *Anaplasma*-infizierte Nymphen.

Rickettsien aus der Zeckenbissfieber-Gruppe wurden in 18 Vogelzecken (4,5 %) nachgewiesen, fünf davon waren Larven (4,0 %) und 13 Nymphen (4,7 %). Zecken von der Greifswalder Oie waren signifikant häufiger (7,3 %) mit Rickettsien infiziert als Zecken aus Reifenstein (1,9 %,  $p = 0,011$ ). In Reifenstein waren nur zwei Amseln mit *Rickettsia*-infizierten Zecken infestiert, während auf der Greifswalder Oie an fünf Vogelarten positive Zecken gefunden wurden. Insgesamt trugen Rotdrosseln (21,1 %) und Amseln (11,4 %) am häufigsten mit Rickettsien infizierte Zecken (Tab. 16). Alle vier *Rickettsia*-Infektionen in Reifenstein traten im Frühjahr auf. Aufgrund der geringen Anzahl positiver Vogelzecken aus diesem Untersuchungsgebiet ist die statistische Untersuchung der Saisonalität für beide Pathogene jedoch nicht sinnvoll.



**Tab. 15 Prävalenzen von *A. phagocytophilum* in von Vögeln abgesammelten Zecken**

Es werden nur Vogelarten gezeigt, an denen *Anaplasma*-positive Zecken gefunden wurden. <sup>G</sup>-Proben stammen ausschließlich von der Greifswalder Oie, La–Larven, Ny–Nymphen, prozentuale Werte in Klammern.

Vogelart	Zeckenstadien	Positive Gesamt	Vögel mit Positiven
Amsel	1 La, 2 Ny	3 (2,4)	2 (5,7)
Rotdrossel <sup>G</sup>	3 Ny	3 (6,3)	2 (10,5)
Rotkehlchen	1 La, 4 Ny	5 (5,5)	4 (7,1)
<b>Gesamt</b>	<b>2 La, 9 Ny</b>	<b>11 (2,7)</b>	<b>8 (5,0)</b>

Bei acht Proben wurde *R. monacensis* per Sequenzanalyse identifiziert, zwei Zecken waren mit *R. helvetica* infiziert. Bei den restlichen acht Proben wurde die Spezies nicht näher charakterisiert (Tab. 16). Eine Amsel war mit zwei *R. monacensis*- und einer *R. helvetica*-infizierten Nympe befallen. Eine Kohlmeise und ein Rotkehlchen trugen jeweils eine Nympe und eine Larve, die mit einer nicht näher charakterisierten *Rickettsia* Spezies infiziert waren.

**Tab. 16 Prävalenzen und Speziesdifferenzierung von SFG-Rickettsien in von Vögeln abgesammelten Zecken**

Es werden nur Vogelarten gezeigt, an denen *Rickettsia*-positive Zecken gefunden wurden. <sup>G</sup>-Proben stammen ausschließlich von der Greifswalder Oie, La–Larven, Ny–Nymphen, \*–Gesamtindividuenzahl zu gering für die Berechnung von Prävalenzen, n.i.–Spezies nicht näher charakterisiert, prozentuale Werte in Klammern.

Vogelart	<i>R. monacensis</i>	<i>R. helvetica</i>	n.i.	Positive Gesamt	Vögel mit Positiven
Amsel	3 Ny	2 Ny	1 Ny	6 (4,8)	4 (11,4)
Kohlmeise <sup>G</sup>	-	-	1 La, 1 Ny	2 (10,5)	1 *
Rotdrossel <sup>G</sup>	3 Ny	-	1 Ny	4 (8,3)	4 (21,1)
Rotkehlchen <sup>G</sup>	1 La	-	3 La, 1 Ny	5 (5,5)	3 (5,4)
Singdrossel <sup>G</sup>	1 Ny	-	-	1 (1,5)	1 (5,9)
<b>Gesamt</b>	<b>1 La, 7 Ny</b>	<b>2 Ny</b>	<b>4 La, 4 Ny</b>	<b>18 (4,5)</b>	<b>13 (8,1)</b>

#### 4.2.4 Infektionen mit Babesien

In insgesamt 34 Vogelzecken (8,5 %) wurden 18S rRNA Fragmente vom Babesien nachgewiesen (Tab. 17). Larven (13,7 %) waren signifikant häufiger mit Babesien infiziert als Nymphen (6,1 %,  $p = 0,011$ ). Auch zwischen den beiden Untersuchungsgebieten zeigten sich deutliche Unterschiede. So trugen Vögel aus Reifenstein (11,8 %) signifikant mehr *Babesia*-infizierte Zecken als auf der Greifswalder Oie (4,7 %,  $p = 0,008$ ). Sechs Vogelarten waren mit *Babesia*-positiven Zecken infestiert (Tab. 17). Da entsprechende

Daten vom Beringer nicht zur Verfügung gestellt werden konnten, war bei drei Vögeln mit positiven Zecken keine Artzuordnung möglich. Unter den Vogelarten mit statistisch relevanten Individuenzahlen (Tab. 12, S. 41) waren Amseln am häufigsten mit positiven Zecken befallen (34,3 %,  $p = 0.003$ ). Die Klassifizierung per Sequenzanalyse ergab für 12 Proben *Ba. microti* und bei 21 Zecken *Ba. divergens*. Eine positive Probe von einer Nymphe wurde nicht näher charakterisiert (siehe Kap. 3.2.6.2, S. 37)

**Tab. 17 Prävalenzen und Speziesdifferenzierung von *Babesien* in von Vögeln abgesammelten Zecken**

Es sind nur Vogelarten aufgelistet, an denen *Babesia*-positive Zecken parasitierten. Die Speziescharakterisierung basiert auf Sequenzanalyse eines 18S rRNA Genfragments. <sup>G</sup>–Proben stammen ausschließlich von der Greifswalder Oie, <sup>R</sup>–Proben stammen ausschließlich aus Reifenstein, La–Larven, Ny–Nymphen, \*–Gesamtindividuenzahl zu gering für die Berechnung von Prävalenzen, n.i. –Spezies nicht näher charakterisiert, n.z.–Art nicht mehr zuordenbar, prozentuale Werte in Klammern.

Vogelart	<i>Ba. microti</i>	<i>Ba. divergens</i>	n.i.	Positive Gesamt	Vögel mit Positiven
Amsel	3 La, 1 Ny	4 La, 11 Ny	1 Ny	20 (16,0)	12 (34,3)
Gimpel <sup>R</sup>	1 La	-	-	1 *	1 *
Heckenbraunelle <sup>R</sup>	1 Ny	-	-	1 *	1 *
Kohlmeise <sup>G</sup>	1 Ny	-	-	1 (5,3)	1 *
Rotkehlchen <sup>G</sup>	2 La, 1 Ny	3 La	-	6 (6,6)	5 (8,9)
Sumpfrohrsänger <sup>R</sup>	-	1 La	-	1 *	1 *
n.z. <sup>R</sup>	2 Ny	2 Ny	-	4 (23,5)	3 *
<b>Gesamt</b>	<b>6 La, 6 Ny</b>	<b>8 La, 13 Ny</b>	<b>1 Ny</b>	<b>34 (8,5)</b>	<b>24 (15,0)</b>

Eine Amsel war mit zwei *Ba. divergens*-infizierten Larven sowie einer Nymphe und einer Larve mit einer *Ba. microti*-Infektion befallen. Eine weitere Amsel trug drei *Ba. divergens*-positive Nymphen. Drei andere Amseln sowie ein Rotkehlchen und ein Vogel, dessen Artzuordnung nicht vorlag, waren mit jeweils zwei *Babesia*-positiven Zecken infestiert. Insgesamt wurden große, von Zecken transovariell übertragene *Ba. divergens*-like Spezies in acht Larven und 13 Nymphen gefunden. Kleine, nicht transovariell übertragene *Ba. microti*-like Arten wurden in sechs Larven und sechs Nymphen nachgewiesen (Tab. 17). Im saisonalen Verlauf der *Babesia*-Infektionen im Untersuchungsgebiet Reifenstein zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fangperioden.

### 4.3 Proben von Kleinsäufern

#### 4.3.1 Infestation

Von Mai bis Oktober 2007 wurden im Untersuchungsgebiet Reifenstein 207 Kleinsäuger gefangen, davon wurden 108 Individuen als Gelbhalsmäuse (*Apodemus flavicollis*) und 99 als Rötelmäuse (*Myodes glareolus*) identifiziert. Von den Kleinsäufern wurden insgesamt 627 *I. ricinus*-Zecken entnommen. Gelbhalsmäuse (mittl. Inf. = 3,5) waren signifikant häufiger infestiert als Rötelmäuse (mittl. Inf. = 2,5;  $p = 0,02$ ). Die hohen Varianzen bei der Berechnung der mittleren Infestation (Gelbhalsmäuse: 12,1; Rötelmäuse: 8,2) weisen darauf hin, dass die Anzahl der parasitierenden Zecken pro Kleinsäuger großen Schwankungen unterworfen war. So variierte die Infestation bei Gelbhalsmäusen von 0 bis 19, bei Rötelmäusen von 0 bis 16. Der Anteil an Individuen, die ausschließlich leicht angesogene bzw. gar keine Zecken trugen, war bei Rötelmäusen signifikant höher (28,7 %,  $p = 0,005$ ) als bei Gelbhalsmäusen (16,2 %). Betrachtet man die einzelnen Entwicklungsstadien der Zecken, so fällt auf, dass der Hauptanteil (97,6 %, 612/627) aus Larven bestand, daneben wurden nur 13 Nymphen (2,1 %) und zwei adulte Weibchen (0,3 %) gefunden. Bei *Ap. flavicollis* wurde ein deutliches Absinken der mittleren Infestation von 6,0 im Frühjahr auf 2,1 im Sommer beobachtet ( $p = 0,000002$ ), zum Herbst hin änderte sie sich dann nicht mehr wesentlich (1,9). Bei *M. glareolus* waren dagegen keine saisonalen Unterschiede erkennbar.

#### 4.3.2 Infektionen mit Borrelien

Von den 612 entnommenen Larven wiesen 354 nur einen sehr geringen Saugzustand auf (siehe Kap. 3.2.3, S. 30), sodass nur die übrigen 258 Larven für molekularbiologische Untersuchungen verwendet wurden (siehe Kap.3.2.3, S.30). Von den 13 Nymphen und zwei Adulti wurden ebenfalls DNA-Proben extrahiert. Die untersuchten Zecken stammten von insgesamt 166 Kleinsäufern (93 Gelbhalsmäuse, 73 Rötelmäuse). Die Prävalenz von Borrelien in Kleinsäugerzecken war mit 2,6 % (7/273) sehr gering. Nur sechs Tiere (3,6 %), zwei Gelbhalsmäuse und vier Rötelmäuse, waren mit *Borrelia*-positiven Zecken (4 Ny, 2 La, 1 Ad) infestiert. Zwischen beiden Kleinsäugerarten wurden keine signifikanten Unterschiede bei den Borrelienprävalenzen in parasitierenden Zecken festgestellt. Jeweils die Hälfte der Infektionen trat im Frühjahr bzw. im Sommer auf. Im Herbst wurden keine *Borrelia*-infizierten Zecken nachgewiesen. Aufgrund der geringen Prävalenzen kann eine Betrachtung der Saisonalität der Borrelieninfektionen statistisch nicht gestützt werden. Die Prävalenz bei Nymphen (30,8 %) und Adulti (50,0 %) war deutlich höher als bei Larven (0,8 %). Zwar ist diese Korrelation aufgrund der geringen Gesamtzahl an Nymphen bzw.

Adulti nicht statistisch belegbar, jedoch ist hier eine Verschiebung der Prävalenzen zu diesen beiden Entwicklungsstadien erkennbar. Die Genospeziesdifferenzierung ergab für zwei Proben *B. burgdorferi* und für drei Amplikons *B. afzelii*. Bei zwei weiteren Proben konnte die Spezies aufgrund zu geringer DNA-Menge nicht bestimmt werden (Tab. 18).

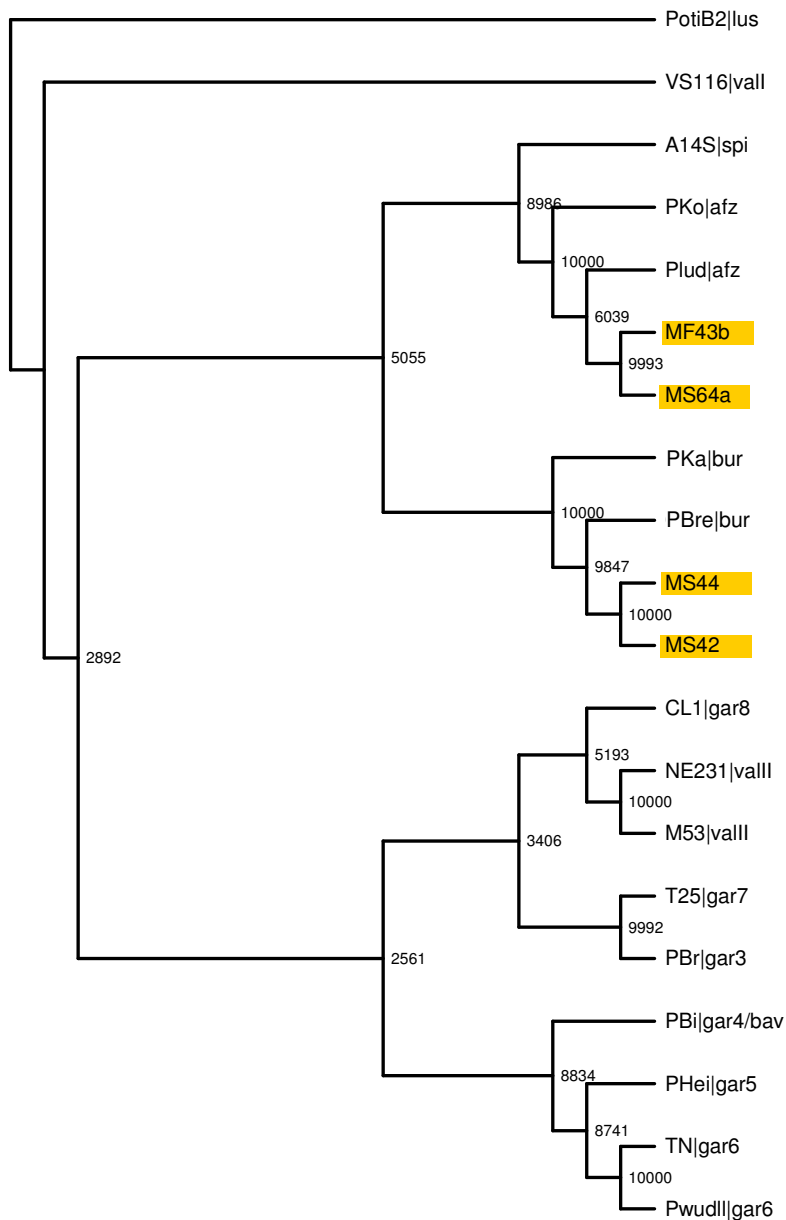
**Tab. 18** *Borrelia* Genospezies in von Kleinsäugetern abgesammelten Zecken aus Reifenstein

In Spalte 5 sind alle weiteren Zecken aufgelistet, die an dem jeweiligen Tier parasitierten. Zecken Nr. MF43a und MF43b stammen vom selben Wirt. MF-Frühjahr, MS-Sommer, neg.–negativ, La– Larve(n), Ny–Nymphe, n.i.–nicht identifizierbar

Zecke Nr.	Kleinsäugerart	Zecken-stadium	Genospezies	weitere Zecken
MF13b	Gelbhalsmaus	La	n.i.	1 La (neg.)
MF38	Rötelmaus	♀	n.i.	-
MF43a+b	Rötelmaus	1 La, 1 Ny	<i>B. afzelii</i>	-
MS42	Rötelmaus	Ny	<i>B. burgdorferi</i>	-
MS44	Rötelmaus	Ny	<i>B. burgdorferi</i>	.
MS64a	Gelbhalsmaus	Ny	<i>B. afzelii</i>	4 La (2 neg., 2 <i>Babesia divergens</i> )

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse durch „multiple alignment“ von Proben, bei denen die RFLP uneindeutige Ergebnisse brachte, sind in Abb. 15 als Kladogramm dargestellt.

Eine Rötelmaus war mit zwei *B. afzelii*-infizierten Zecken (1 Ny, 1 La) infestiert. Aussagen über eventuelle Unterschiede in der Verteilung der Genospezies zwischen beiden Kleinsäugerarten können aufgrund der geringen Infektionsraten nicht getroffen werden. Die Untersuchung der Ohrbiotope mittels PCR brachte kein positives Ergebnis.

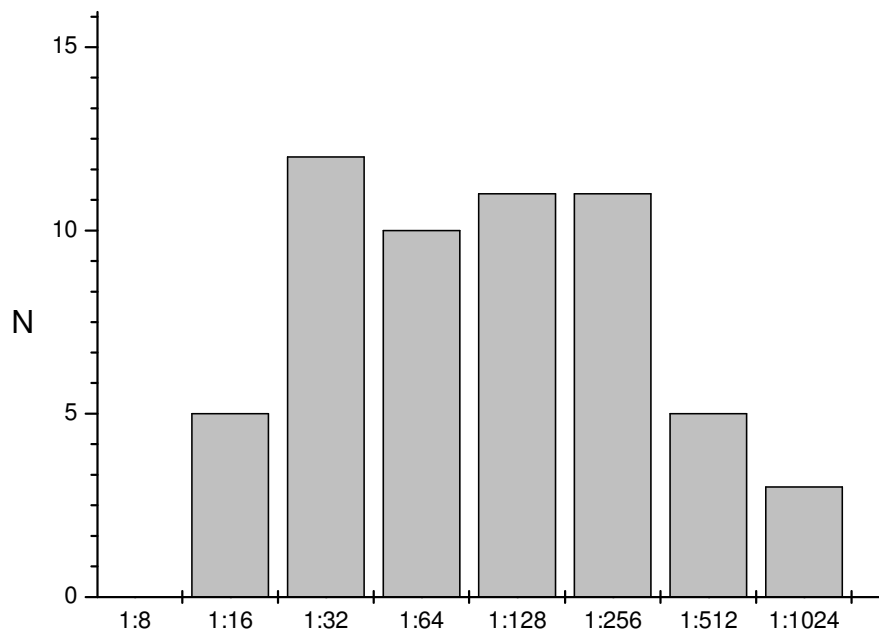


**Abb. 15 Phylogenetische Analyse der sequenzierten *osp4* Fragmente aus an Kleinsäugetern parasitierenden Zecken**

Es sind nur die sequenzierten Proben dargestellt, bei denen eine eindeutige Identifizierung der *Borrelia*-Genospezies möglich war. Die Referenzstränge (Stamm|Genospezies) wurden der NCBI-Datenbank entnommen (siehe Anhang, S. XVII). Als „outgroup“ wurde *B. lusitaniae* (Stamm PotiB2) verwendet. Die Bootstrap-Werte bezeichnen die Wahrscheinlichkeit, mit der eine bestimmte Verzweigung beim Alignment eintritt (Kap. 3.2.8.2, S. 38). Die analysierten Proben sind gelb unterlegt. bur–*B. burgdorferi*, afz–*B. afzelii*, gar4/bav–*B. bavariensis*, gar3 bis gar8–*B. garinii* (OspA Typen 3-8), val I und II–*B. valaisiana* (Subtypen I und II), lus–*B. lusitaniae*, spi–*B. spielmanii*

### 4.3.3 Serologische Untersuchungen

Für die Untersuchung der Anti-Borrelien-IgG-Titer wurden Blutproben von 203 Kleinsäugern (106 Gelbhalsmäuse, 97 Rötelmäuse) per IFT untersucht. Insgesamt 57 Kleinsäuger (28,1 %) wiesen Antikörper gegen Borrelien auf, 30 davon waren Gelbhalsmäuse (28,3 %) und 27 Rötelmäuse (27,8 %). Der durchschnittliche Antikörpertiter bei den Seropositiven lag bei 1:192. Weder in der Seroprävalenz noch in der Höhe der Antikörpertiter wurden signifikante Unterschiede zwischen beiden Kleinsäugerarten festgestellt. Die Verteilung der Antikörpertiter ist in Abb. 16 dargestellt. Um die Antikörpertiter mit den Infestationszahlen zu vergleichen und eventuelle Korrelationen aufzudecken, wurde eine lineare Regression durchgeführt. Keine der beiden Kleinsäugerarten zeigte eine Korrelation zwischen diesen beiden Parametern ( $R^2 = 0,005$ ).



**Abb. 16** Verteilung der Anti-Borrelien-IgG-Titer bei Kleinsäugern aus Reifenstein

Die Antikörpertiter wurden mittels IFT bestimmt. Proben von *Ap. flavicollis* und *M. glareolus* wurden zusammengefasst. 146 von 203 Tieren zeigten keine IgG-Reaktion gegen Borrelien. Der Schwellenwert lag bei einem Titer von 1:8, alle festgestellten Titer lagen über diesem Wert. N–Individuenzahl

Saisonal zeigte sich insgesamt ein signifikanter Anstieg der Seroprävalenz vom Frühjahr (15,0 %) zum Sommer (42,9 %,  $p = 0,00009$ ). Im Herbst sank sie nur leicht auf 37,5 %. Ein Ähnlicher Verlauf wurde auch im Einzelnen bei *Ap. flavicollis* beobachtet. Auch hier stieg die Seroprävalenz deutlich in der ersten Jahreshälfte von 10,3 % auf 48,6 % ( $p = 0,0002$ ), und sank zum Herbst wieder nicht signifikant ab (26,7 %,  $p = 0,06$ ). Anders stellte sich dagegen der Jahresverlauf bei *M. glareolus* dar. Hier stieg die Seroprävalenz

vom Frühjahr (18,0 %) über den Sommer (34,6 %) bis zum Herbst (70 %). Allerdings ist diese Erhöhung aufgrund der teils geringen saisonalen Individuenzahlen von *M. glareolus* statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). In der Höhe der Antikörpertiter wurde bei keiner der beiden Kleinsäugerarten eine deutliche saisonale Änderung nachgewiesen.

Betrachtet man die Antikörpertiter von Kleinsäufern, an denen *Borrelia*-positive Zecken gefunden wurden, so fällt auf, dass nur zwei Nager, eine Rötelmaus und eine Gelbhalsmaus mit *B. afzelii*-infizierten Zecken, einen erhöhten Titer von 1:128 aufwiesen. Die anderen vier Tiere waren seronegativ bzw. hatten, im Falle einer Rötelmaus mit einer *B. burgdorferi*-infizierten Nymphe, nur einen niedrigen IgG-Titer von 1:16.

#### 4.3.4 Infektionen mit Anaplasmen und Rickettsien

Auch die Prävalenz von *A. phagocytophilum* in Zecken von Kleinsäufern war sehr niedrig. Nur drei Gelbhalsmäuse (3,2 %) trugen jeweils eine *Anaplasma*-infizierte Larve (Tab. 19). Bei Rötelmäusen wurden keine infizierten Zecken nachgewiesen. Die Tiere mit positiven Larven trugen keine weiteren Zecken. Insgesamt betrug die Prävalenz von *Anaplasma*-Infektionen in Kleinsäugerzecken daher nur 1,1 %, und 1,8 % aller Kleinsäuger trugen *A. phagocytophilum*-infizierte Zecken. Die *Anaplasma*-Infektionen traten ausschließlich im Sommer auf. Keines der untersuchten Biotope war PCR-positiv für Anaplasmen.

**Tab. 19** *A. phagocytophilum* und *Rickettsia* Spezies in von Kleinsäufern abgesammelten Zecken aus Reifenstein

Die Daten basieren auf RFLP bzw. Sequenzanalyse eines 16S rRNA- (*Anaplasma*), bzw. *gltA*-Genfragments (*Rickettsia*). In Spalte 5 sind alle weiteren Zecken aufgelistet, die an dem jeweiligen Tier parasitierten. MF- Frühjahr, MS-Sommer, MH-Herbst, neg.-negativ, La- Larve

Zecke Nr.	Kleinsäugerart	Zeckenstadium	Spezies	weitere Zecken
MS31	Gelbhalsmaus	La	<i>A. phagocytophilum</i>	-
MS35	Gelbhalsmaus	La	<i>A. phagocytophilum</i>	-
MS36	Gelbhalsmaus	La	<i>A. phagocytophilum</i>	-
MF18b	Rötelmaus	La	<i>R. helvetica</i>	1 La ( <i>Ba. microti</i> )
MF24	Gelbhalsmaus	La	<i>Rickettsia</i> ssp.	-
MF27c	Gelbhalsmaus	La	<i>R. helvetica</i>	3 La (neg.)
MF30a	Gelbhalsmaus	La	<i>R. helvetica</i>	1 La (neg.)
MH16	Gelbhalsmaus	La	<i>R. helvetica</i>	-

SFG-Rickettsien wurden in fünf Larven, die an Kleinsäugern parasitierten, nachgewiesen (1,8 %). Die positiven Larven stammen von fünf Tieren (3,0 %), vier Gelbhalsmäusen (4,3 %) und einer Rötelmaus (1,4 %). Bei vier Amplikons ergab die Speziesidentifizierung per Sequenzanalyse *R. helvetica*, eine *Rickettsia*-positive Probe von einer Larve, die an einer Gelbhalsmaus parasitierte, konnte nicht näher charakterisiert werden (Tab. 19). Vier *Rickettsia*-Infektionen traten im Frühjahr auf, eine im Herbst. Auch für Rickettsien erbrachte die molekularbiologische Untersuchung der Bioplate keine positiven Ergebnisse.

#### 4.3.5 Infektionen mit Babesien

Die Prävalenz von *Babesia* spp. in an Kleinsäugern parasitierenden *I. ricinus*-Zecken lag bei 6,6 % (18/273, Tab. 20). Zwischen Zecken von Gelbhalsmäusen (5,4 %) und Rötelmäusen (8,4 %) wurden keine signifikanten Unterschiede in der *Babesia*-Prävalenz festgestellt. Die *Babesia*-positiven Zecken stammen von 17 Kleinsäugern (10,2 %), wobei auch hier keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Arten erkennbar waren (Tab. 20). Zwar waren Nymphen (30,8 %) deutlich häufiger mit Babesien infiziert als Larven (5,4 %), jedoch kann dem Ergebnis aufgrund des stark unterschiedlichen Stichprobenumfangs beider Gruppen (Kap. 4.3.2, S. 49) keine statistische Relevanz beigemessen werden ( $p = 0,06$ ).

Die Speziesidentifizierung durch Sequenzanalyse eines 18S rRNA-Genfragments ergab bei zehn Proben *Ba. microti* und bei sieben Proben *Ba. divergens*. Eine Probe wurde nicht näher charakterisiert. Hinsichtlich der *Babesia* Spezies wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kleinsäugerarten deutlich. Alle *Ba. divergens*- und sieben von zehn *Ba. microti*-Proben stammen von Larven. Eine Gelbhalsmaus war mit zwei *Ba. divergens*-infizierten Larven befallen (Tab. 20).

Die Gesamtprävalenz Babesien-infizierter Zecken von Kleinsäugern stieg vom Frühjahr (3,4 %) zum Sommer deutlich an (10,1 %,  $p = 0,039$ ) und änderte sich im Herbst nicht mehr wesentlich (10,3 %). Betrachtet man die Anzahl der Kleinsäuger mit *Babesia*-positiven Zecken, stellt man eine ähnliche Entwicklung im Jahresverlauf fest, diese ist jedoch statistisch nicht signifikant ( $p = 0,18$ ).



**Tab. 20** *Babesia* spp. in von Kleinsäugetern abgesammelten Zecken aus Reifenstein

Die Daten basieren auf RFLP bzw. Sequenzanalyse eines 18S rRNA-Genfragments. In Spalte 5 sind alle weiteren Zecken aufgelistet, die an dem jeweiligen Tier parasitierten. Die positiven Larven Nr. MF64c und MF64e stammen vom selben Wirt. MF-Frühjahr, MS-Sommer, MH-Herbst, neg.–negativ, La–Larve(n), Ny–Nymphe(n), Prävalenzen in Klammern

<b>Zecke Nr.</b>	<b>Kleinsäugerart</b>	<b>Zecken-stadium</b>	<b>Spezies</b>	<b>weitere Zecken</b>
MF6	Rötelmaus	Ny	<i>Ba. microti</i>	-
MF18a	Rötelmaus	La	<i>Ba. microti</i>	1 La ( <i>R. helvetica</i> )
MF19	Rötelmaus	Ny	<i>Ba. microti</i>	-
MF59a	Gelbhalsmaus	La	<i>Ba. divergens</i>	2 La (neg.)
MF102b	Gelbhalsmaus	Ny	<i>Ba. microti</i>	1 La (neg.)
MS28c	Rötelmaus	La	<i>Ba. divergens</i>	2 La (neg.)
MS29b	Rötelmaus	La	<i>Ba. divergens</i>	2 La (neg.)
MS35	Gelbhalsmaus	La	<i>Ba. divergens</i>	-
MS38	Gelbhalsmaus	La	<i>Ba. microti</i>	-
MS43	Rötelmaus	La	<i>Ba. microti</i>	-
MS44	Rötelmaus	Ny	<i>Babesia</i> ssp.	-
MS48	Gelbhalsmaus	La	<i>Ba. divergens</i>	-
MS64c+e	Gelbhalsmaus	2 La	<i>Ba. divergens</i>	1 Ny ( <i>B. afzelii</i> ), 2 La (neg.)
MH27	Rötelmaus	La	<i>Ba. microti</i>	-
MH31a	Rötelmaus	La	<i>Ba. microti</i>	1 La (neg.)
MH37	Gelbhalsmaus	La	<i>Ba. microti</i>	-
MH39	Gelbhalsmaus	La	<i>Ba. microti</i>	-
<b>Gesamt:</b>	<b>8 <i>Ap. flavicollis</i> (8,6) 9 <i>M. glareolus</i> (12,3)</b>	<b>14 La (5,4) 4 Ny (30,8)</b>	<b>10 <i>Ba. microti</i> 7 <i>Ba. divergens</i> 1 <i>Babesia</i> ssp.</b>	

#### 4.4 Freilandgefangene Zecken

Zur Bestimmung der Prävalenz zeckenassoziierter Erreger in wirtssuchenden Zecken wurden im Untersuchungsgebiet Reifenstein, sowie in vier Gebieten an der deutschen Ostseeküste Freilandzecken gesammelt. Da auf der Greifswalder Oie an zwei Fangtagen nur sechs Freilandzecken gefunden wurden, konnte dieses Gebiet nicht in die Auswertung einbezogen werden. Es wurden daher vor allem touristisch bedeutsame Gebiete auf der nahegelegenen Insel Usedom, sowie ein Areal in der Nähe von Rostock gewählt (Abb. 9, S. 30). Insgesamt wurden 708 *I. ricinus*-Zecken gesammelt. Der überwiegende Anteil bestand aus Nymphen (631; 89,1 %), daneben wurden 32 adulte Weibchen (4,5 %) und 45 Männchen (6,4 %) gesammelt.

Hinsichtlich der Zeckendichte wurde zwar keine detaillierte Datenerfassung vorgenommen, es sind jedoch anhand der absoluten Fangzahlen (Tab. 21) in den Untersuchungsgebieten einige Tendenzen erkennbar, da alle Zecken mit der gleichen Methode bei ähnlichen Wetterbedingungen gesammelt wurden und die Sammeldauer pro Tag gleich lang war. So war beispielsweise auffällig, dass im Gebiet Reifenstein generell weniger Zecken zu finden waren als in anderen Gebieten. Zwar war hier die Individuenzahl insgesamt höher als in den meisten anderen Arealen, jedoch waren zum Erreichen dieser Anzahl mehrere Fangtage nötig, wohingegen in den anderen Gebieten (außer Greifswalder Oie) nur jeweils an einem Tag gesammelt wurde. Die höchste Zeckenaktivität lag im Gebiet Ückeritz vor, die geringste dagegen auf der Greifswalder Oie (siehe oben).

**Tab. 21 Fangzahlen wirtssuchender *I. ricinus*-Zecken in Reifenstein und vier Gebieten der deutschen Ostseeregion**

Die Lage der Untersuchungsgebiete ist in Abb. 9 (S. 30) verzeichnet. \*–Zecken aus diesem Gebiet wurden nur auf Infektionen mit *Borrelia* spp. untersucht

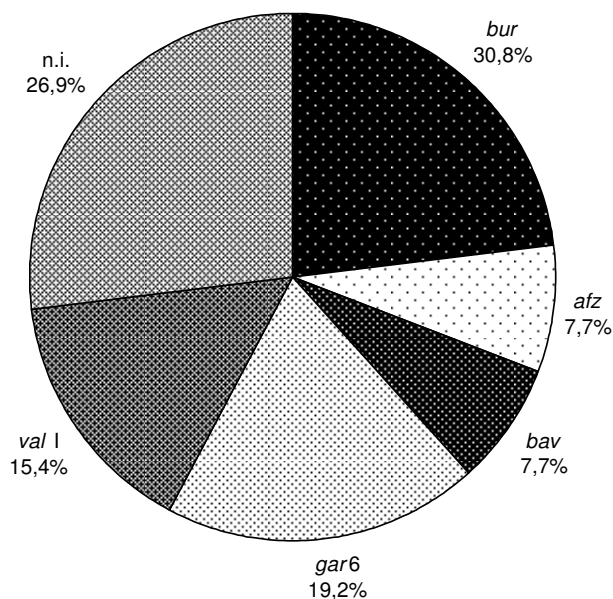
Gebiet	Nymphen	Adulti (♀;♂)	Gesamt	Fangperiode
Reifenstein	162	34 (14;20)	<b>196</b>	Juni-September 2007
Karlshagen	77	4 (1;3)	<b>81</b>	Juli 2008
Bansin	110	9 (5;4)	<b>119</b>	Juli 2008
Ückeritz*	204	15 (4;11)	<b>219</b>	Juli 2008
Hütter Wohld	78	15 (8;7)	<b>93</b>	Juni 2008
<b>Gesamt</b>	<b>631</b>	<b>77 (32;45)</b>	<b>708</b>	

#### 4.4.1 Infektionen mit Borrelien

In 26 von 708 wirtssuchenden *I. ricinus*-Zecken wurden *Borrelia* spp.-spezifische *ospA*-Fragmente nachgewiesen. Dies entspricht einer Gesamtprävalenz von 3,7 %. Adulte Männchen (11,1 %) waren signifikant häufiger infiziert als Nymphen (3,3 %;  $p = 0,024$ ). Da die 32 adulten Weibchen jedoch keine Borrelieninfektionen zeigten, waren die Prävalenzen von Nymphen und Adulti (6,5 %) nicht deutlich verschieden ( $p = 0,14$ ).

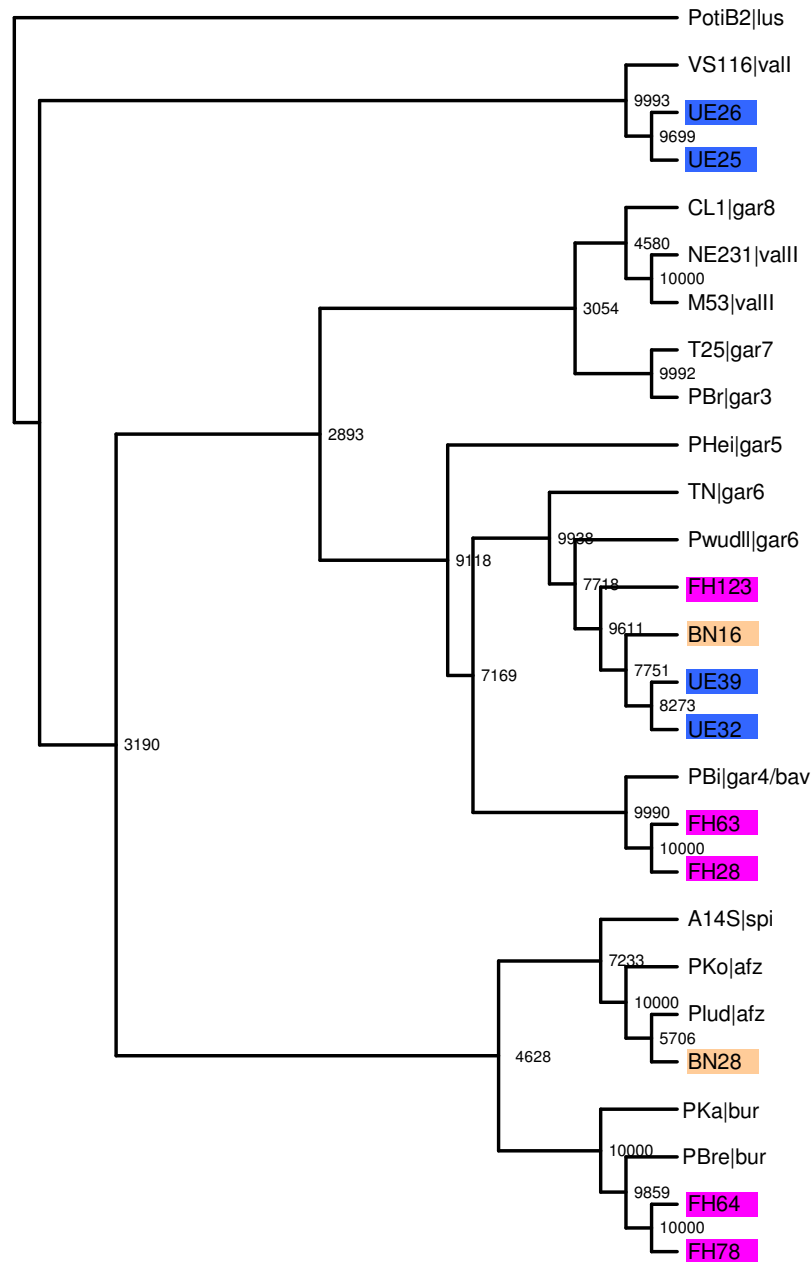
Die Gesamtprävalenzen in den verschiedenen Untersuchungsgebieten reichten von 0 % im Hütter Wohld bis zu 5,1 % in Reifenstein. Fisher's Exakter Test ergab, dass die Borrelienprävalenzen in den Gebieten Ückeritz (4,6 %) und Reifenstein (5,1 %) deutlich höher waren als im Hütter Wohld (0 %,  $p = 0,027$  bzw. 0,019). Aufgrund der kleineren Stichprobe im Hütter Wohld ( $N = 93$ ), waren die Unterschiede zu den Gebieten Karshagen (2,5 %) und Bansin (3,4 %) nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Am häufigsten wurde *B. burgdorferi* nachgewiesen (30,8 % der Positiven, Abb. 17). Die zweithäufigste Spezies war *B. garinii* OspA Typ 6 (19,2 %), gefolgt vom *B. valaisiana* Subtyp I (15,4 %). *Borrelia afzelii* und *B. bavariensis* waren mit je 7,7 % gleichhäufig vertreten. Ein relativ hoher Anteil von 26,9 % der *Borrelia*-positiven Proben konnte nicht näher charakterisiert werden, da die Menge der PCR-Produkte zu gering, bzw. die Fragmentlängen zu kurz waren. Koinfektionen mit mehreren *Borrelia*-Genospezies wurden nicht gefunden.



**Abb. 17** Spektrum der *Borrelia*-Genospezies in wirtssuchenden *I. ricinus*-Zecken

Proben aus Reifenstein und von der Insel Usedom wurden zusammengefasst. Die prozentualen Werte beziehen sich auf die Gesamtzahl von 26 positiven Proben. bur–*B. burgdorferi*, afz–*B. afzelii*, bav–*B. bavariensis*, gar6–*B. garinii* (OspA Typ 6), val I–*B. valaisiana* (Subtyp I), n.i.–Genospezies nicht identifizierbar



**Abb. 18 Phylogenetische Analyse der sequenzierten *ospA*-Fragmente aus Freilandzecken**

Es sind nur die sequenzierten Proben dargestellt, bei denen eine eindeutige Identifizierung der *Borrelia*-Genospezies möglich war. Die Referenzstränge (Stamm|Genospezies) wurden der NCBI-Datenbank entnommen (siehe Anhang, S. XVII). Als „outgroup“ wurde *B. lusitaniae* (Stamm PotiB2) verwendet. Die Bootstrap-Werte bezeichnen die Wahrscheinlichkeit, mit der eine bestimmte Verzweigung beim Alignment eintritt (Kap. 3.2.8.2, S. 38). Nicht alle Werte liegen im signifikanten Bereich. Einzel-Alignments der jeweiligen Proben mit den selben Referenzstämmen und ein Abgleich mit der NCBI-Datenbank bestätigten aber die Ergebnisse. Aus Platzgründen werden diese Baumdiagramme nicht gezeigt und alle Proben wurden in einem Kladogramm zusammengefasst. Proben aus Reifenstein sind violett, Proben von der Insel Usedom hellbraun (Bansin) bzw. blau (Ückeritz) unterlegt. bur–*B. burgdorferi*, afz–*B. afzelii*, gar4/bav–*B. bavariensis*, gar3 bis gar8–*B. garinii* (OspA Typen 3-8), val I und II–*B. valaisiana* (Subtypen I und II), lus–*B. lusitaniae*, spi–*B. spielmanii*

Eine Chi-Quadrat Analyse zwischen den beiden Untersuchungsgebieten mit der höchsten Borrelienprävalenz (Reifenstein und Ückeritz) und der Verteilung der Genospezies ergab, dass das Spektrum der Borrelienarten unabhängig vom Untersuchungsgebiet ist ( $p = 0,32$ ). Fasst man alle Ostseegebiete zusammen und vergleicht das Artenspektrum mit dem von Reifenstein, so ergibt der Chi-Quadrat Test ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,17$ ).

#### 4.4.2 Infektionen mit Anaplasmen und Rickettsien

*Anaplasma phagocytophilum*-spezifische DNA wurde in nur drei Freilandzecken gefunden (0,6 %). Alle drei Infektionen wurden in Zecken (2 Ny, 1 ♀) aus Bansin nachgewiesen, so dass für dieses Gebiet eine *Anaplasma*-Prävalenz von 2,5 % errechnet werden konnte.

In 33 wirtssuchenden *I. ricinus* wurden SFG-Rickettsien nachgewiesen (6,7 %). Zecken aus dem Hütter Wohld (2,2 %) zeigten eine deutlich geringere Prävalenz von Rickettsieninfektionen als Zecken aus Karlshagen (9,9 %,  $p = 0,03$ ) und Reifenstein (7,7 %,  $p = 0,049$ ). Ansonsten ergab der Vergleich der Untersuchungsgebiete im Bezug auf die *Rickettsia*-Prävalenz keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ). Betrachtet man die beiden Zeckenstadien, so zeigten zwar Nymphen (7,0 %) eine etwas höhere Infektionsrate mit Rickettsien als Adulti (4,8 %), jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,38$ ). Ein Großteil der *Rickettsia*-positiven Proben (57,6 %) konnte phylogenetisch nicht näher charakterisiert werden, weshalb eine statistische Analyse der Verteilung der *Rickettsia* Spezies in den einzelnen Untersuchungsgebieten nicht möglich ist. Bei jeweils zwei Nymphen aus Karlshagen und Bansin wurde *R. monacensis* identifiziert. *Rickettsia helvetica* wurde in je zwei Nymphen aus Reifenstein und Bansin, vier Nymphen aus Karlshagen sowie einem Weibchen und einer Nymphe aus dem Hütter Wohld nachgewiesen.

#### 4.4.3 Infektionen mit Babesien

In insgesamt 47 Freilandzecken (46 Ny, 1 ♀) wurden *Babesia*-spezifische Fragmente des 18S rRNA-Gens nachgewiesen (9,6 %). Nymphen (10,8 %) waren signifikant häufiger mit Babesien infiziert als Adulti (1,6 %,  $p = 0,01$ ). Auch in Abhängigkeit vom Untersuchungsgebiet wurden signifikante Unterschiede in der Prävalenz von Babesien in wirtssuchenden Zecken festgestellt. So zeigten Zecken aus den Gebieten Karlshagen (17,3 %) und Bansin (10,1 %) eine deutlich höhere Babesienprävalenz als Zecken aus dem Hütter Wohld (0,0 %,  $p = 0,00001$  bzw. 0,001). Im Gebiet Reifenstein lag die Infektionsrate bei 10,7 % und war somit ebenfalls signifikant höher als im Hütter Wohld ( $p = 0,0002$ ).

Mittels Sequenzanalyse konnten alle positiven Proben näher charakterisiert werden. So wurde die überwiegende Mehrheit der *Babesia*-positiven Proben (68,1 %) als *Ba. microti* identifiziert. *Babesia divergens* wurde in 14 Proben festgestellt (31,9 %). Der Anteil von *Ba. microti* an der Gesamtprävalenz von Babesien variierte zwar je nach Untersuchungsgebiet von 52,4 % in Reifenstein über 71,4 % in Karlshagen bis zu 91,7 % in Bansin, ein Chi-Quadrat Test auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  ergab jedoch keine signifikante Abhängigkeit der Verteilung der *Babesia* Spezies vom Untersuchungsgebiet ( $p = 0,063$ ).

#### 4.5 Koinfektionen mit verschiedenen Pathogenen

Bei insgesamt 10,0 % aller positiven Zecken wurden Koinfektionen mit verschiedenen Pathogenen festgestellt (Tab. 22). Da diese oft zu schwierigeren Krankheitsverläufen sowie Behandlungsproblemen führen (Kap. 2.1.1, S. 4), wird in diesem Kapitel auf die bei den eigenen Untersuchungen aufgetretenen Koinfektionen näher eingegangen. Der höchste Anteil an Koinfektionen mit Vertretern einer anderen Pathogengruppe wurde bei *A. phagocytophilum*- (17,6 %) und *Rickettsia*-Positiven (17,9 %) beobachtet. Bei Borrelien und Babesien war der Anteil etwas geringer (12,0 % bzw. 13,0 %, Tab. 22). Unter den *Borrelia*-positiven Proben zeigten 5,4 % eine Koinfektion mit mindestens einer weiteren Borreliensart (Tab. 23, S. 61). Unter den „Emerging Pathogens“ konnten Koinfektionen innerhalb der jeweiligen Gattung nicht bestimmt werden, da hier die RFLP nur mit einem Enzym und nur zur Validierung der PCR-Positiven durchgeführt wurde (Kap. 3.2.6, S. 35).

**Tab. 22 Interspezifische Koinfektionen in Zecken unterschiedlichen Ursprungs**

Koinfektionen mit mehreren Pathogenen der gleichen Gattung sind nicht aufgelistet. \*–Stichprobe zu klein für statistisch relevante Aussage.  $N_{Koinf.}/N_{Pos.}$  (%)

Pathogengruppe	Vogelzecken	Kleinsäugerzecken	Freilandzecken	Gesamt
<i>Borrelia</i> spp.	7/59 (11,9)	1/7 *	3/26 (11,5)	<b>11/92 (12,0)</b>
<i>A. phagocytophilum</i>	2/11 *	1/3 *	0/3 *	<b>3/17 (17,6)</b>
<i>Rickettsia</i> spp.	6/18 (33,3)	0/5 *	4/33 (12,1)	<b>10/56 (17,9)</b>
<i>Babesia</i> spp.	7/34 (20,6)	2/18 (11,1)	4/48 (8,3)	<b>13/100 (13,0)</b>
<b>Gesamt</b>	<b>16/105 (15,2)</b>	<b>2/31 (6,5)</b>	<b>6/104 (5,8)</b>	<b>24/240 (10,0)</b>

In Vogelzecken (15,2 %) war der Anteil an Koinfektionen insgesamt wesentlich höher als in Freilandzecken (5,8 %,  $p = 0,021$ ). Positive Zecken von Kleinsäufern waren zu 6,5 % koinfiziert, aufgrund der weitaus geringeren Anzahl positiver Zecken an Kleinsäufern ist der Unterschied zu den Vogelzecken aber nicht signifikant (Tab. 22). Betrachtet man die

Kombinationen der verschiedenen Erregerspezies, so fällt auf, dass Koinfektionen in einer Vielzahl unterschiedlicher Zusammensetzungen möglich sind (Tab. 23). Am häufigsten waren Kombinationen zwischen *Borrelia* spp. und *Babesia* spp. oder *Rickettsia* spp. (27,2 % bzw. 25,0 % aller Koinfektionen). Nur Koinfektionen zwischen *A. phagocytophilum* und *Borrelia* spp. wurden nicht beobachtet (Abb. 21, S. 91), was aber durch die insgesamt niedrige Prävalenz von Anaplasmen (1,5 %) begründet sein könnte.

**Tab. 23 Übersicht der in Zecken unterschiedlichen Ursprungs aufgetretenen Koinfektionen**

Die aufgetretenen Ergerkombinationen bei Koinfektionen mit Vertretern zweier verschiedener Pathogengruppen sind unterschiedlich markiert. \*/\*\*–Zecken stammen jeweils vom selben Wirt, La–Larve, Ny–Nymphe, bur–*B. burgdorferi*, afz–*B. afzelii*, bav–*B. bavariensis*, gar5 bis 8–*B. garinii* (OspA Typen 5 bis 8), val I–*B. valaisiana* (Subtyp I), mon–*R. monacensis*, helv–*R. helvetica*, div–*Ba. divergens*, mic–*Ba. microti*, Herkunft nach Codierung: VF, VS, VH, MS, FF, FH–Reifenstein, GV–Greifswalder Oie, BN–Bansin

Herkunft	Zecke Nr.	Stadium	Borrelien	HGA-Erreger	Rickettsien	Babesien
Amsel*	VF1h	La		<i>A. phagocytophilum</i>		div
Amsel*	VF1i	Ny	bav		mon	
Amsel	VF24b	Ny	gar5+6			
Amsel	VF25c	Ny			<i>Rickettsia</i> ssp.	div
Amsel	VF27b	Ny	val I+gar6			
Amsel*	VS40a	La	val I+gar6+gar8			
Amsel*	VS40b	La	val I+gar8			
Amsel**	VH95c	La	bur			div
Amsel**	VH95d	La	gar6			div
Amsel**	VH95f	La	gar6			div
Rotdrossel	GV13a	Ny		<i>A. phagocytophilum</i>	mon	
Rotkehlchen*	GV52a	La	afz		<i>Rickettsia</i> ssp.	
Rotkehlchen*	GV52c	Ny	gar6		<i>Rickettsia</i> ssp.	
Rotkehlchen	GV80a	La			mon	mic
Kohlmeise	GV88d	Ny	<i>Borrelia</i> ssp.			mic
Singdrossel	GV97b	Ny	gar6+8			
Gelbhalsmaus	MS35	La		<i>A. phagocytophilum</i>		div
Rötelmaus	MS44	Ny	bur			<i>Babesia</i> ssp.
Freiland	FF27	Ny			<i>Rickettsia</i> ssp.	div
Freiland	FH87	Ny	val I		<i>Rickettsia</i> ssp.	
Freiland	FH134	Ny	bur			div
Freiland	BN11	Ny	<i>Borrelia</i> ssp.			mic
Freiland	BN66	Ny	<i>Borrelia</i> ssp.		helv	
Freiland	BN33	Ny			mon	mic

Mehr als ein Drittel der Amseln war entweder mit koinfizierten oder mehreren Zecken befallen, die jeweils mit unterschiedlichen Erregern infiziert waren (Tab. 24). Auffällig war, dass eine stark infestizierte Amsel (VF1) Zecken trug, die mit Pathogenen aus allen vier in dieser Arbeit untersuchten Gruppen infiziert waren (1Ny/1La *A. phagocytophilum*, 1Ny *B. valaisiana* Subtyp II, 1Ny *B. bavariensis*, 2Ny *R. monacensis*, 1Ny *R. helvetica*, 1La *Ba. divergens*). In einer Larve und einer Nymphe von diesem Vogel wurden Koinfektionen festgestellt (Tab. 23). Daneben wurden fünf Amseln gefangen, an denen Zecken parasitierten, die mit drei verschiedenen Pathogenen infiziert waren. Insgesamt wurden an 13,1 % der Vögel Zecken mit unterschiedlichen Infektionen oder Koinfektionen gefunden. Bei den Kleinsäugetern waren es dagegen nur 2,4 %. 30,4 % der Vögel, die positive Zecken trugen, waren auch mit Zecken befallen, die mit mindestens einem anderen Erreger infiziert bzw. koinfiziert waren. Bei Amseln lag diese Zahl bei 52,2 %, bei Rotkehlchen dagegen nur bei 10,5 %. Kleinsäuger zeigten dabei ebenfalls einen geringeren Wert von 14,3 % (Tab. 24).

**Tab. 24 Wirtstiere, die mit Zecken mit verschiedenen Pathogen-Infektionen infestiert waren**

Es wurden sowohl Individuen einbezogen, die mit koinfizierten Zecken befallen waren, als auch Tiere mit mehreren Zecken, die verschiedene Infektionen aufwiesen. In den Spalten 2 bis 4 ist die Anzahl an Wirtstieren aufgelistet, die Zecken mit insgesamt 2, 3 oder 6 verschiedenen Erregern trugen. n.z.–Vogelspezies nicht mehr zuordenbar, da Daten vom Beringer fehlen, ges.–gesamt, \*–Stichprobenumfang zu gering

Wirtsspezies	2 Pathogene	3 Pathogene	6 Pathogene	Gesamt (%)	% von Tieren mit Positiven
Amsel	6	5	1	12 (34,3)	52,2
Singdrossel	3	-	-	3 (17,6)	*
Rotdrossel	2	-	-	2 (10,5)	20,0
Rotkehlchen	2	-	-	2 (3,6)	10,5
Kohlmeise	-	1	-	1 (20,0)	*
n.z.	1	-	-	1 (16,7)	*
<b>Vögel ges.</b>	<b>14</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>21 (13,1)</b>	<b>30,4</b>
Gelbhalsmaus	2	-	-	2 (2,2)	13,3
Rötelmaus	2	-	-	2 (2,7)	15,4
<b>Kleinsäuger ges.</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>4 (2,4)</b>	<b>14,3</b>
<b>Gesamt:</b>	<b>18</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>25 (7,7)</b>	<b>25,8</b>

#### 4.6 Vergleich der Prävalenzen verschiedener Pathogene

In den folgenden Kapiteln werden die Prävalenzen der Pathogenspezies in Zecken von verschiedenen Wirtstieren bzw. Freilandzecken aus dem Untersuchungsgebiet Reifenstein gegenübergestellt und verglichen.



#### 4.6.1 *Borrelia* spp.

Der Vergleich der Gesamtprävalenz von *Borrelia* spp. in Zecken verschiedenen Ursprungs aus dem Gebiet Reifenstein zeigt, dass Vogelzecken (15,2 %) signifikant häufiger infiziert waren als Zecken von Kleinsäufern (2,6 %,  $p = 3,5 \cdot 10^{-7}$ ) und wirtssuchende Zecken (5,1 %,  $p = 0,0006$ ).

Eine noch stärkere Signifikanz ergibt sich, wenn man nur die gesogenen Larven mit freilandgefangenen Nymphen vergleicht (Abb. 19, S. 66). Diese Gegenüberstellung ist sinnvoll, da Borrelieninfektionen bei Larven mit hoher Wahrscheinlichkeit vom Wirt aufgenommen wurden und infizierte Nymphen aus dem Freiland nur durch vorheriges Saugen an einem Reservoirwirt Borrelien aufgenommen haben können (Kap. 2.1.2, S. 4 und 2.2.4, S. 11). Larven von Vögeln waren zu 20,6 % mit Borrelien infiziert, Larven von Kleinsäufern dagegen deutlich seltener (0,8 %,  $p = 7,9 \cdot 10^{-9}$ ). Auch wirtssuchende Nymphen zeigten eine signifikant geringere Prävalenz von *Borrelia* spp. (2,5 %,  $p = 0,000015$ ) als an Vögeln parasitierende Larven. Die Unterschiede zwischen Kleinsäuger- und Freilandzecken waren dagegen nicht signifikant, weder in der Gesamtprävalenz, noch bei ausschließlicher Betrachtung gesogener Larven und wirtssuchender Nymphen ( $p > 0,05$ ).

Vergleicht man den Anteil der Individuen mit *Borrelia*-positiven Zecken (Abb. 20, S. 67), so fällt auf, dass wesentlich mehr Vögel (27,9 %) mit mindestens einer positiven Zecke infestiert waren, als dies bei Kleinsäufern (3,6 %,  $p = 8,3 \cdot 10^{-7}$ ) der Fall war. Ein ähnlich deutliches Resultat ergibt der Vergleich unter ausschließlicher Betrachtung von Individuen mit positiven Larven. Bei den Vögeln waren 11,5 % der Tiere mit mindestens einer *Borrelia*-infizierten Larve befallen, bei den Kleinsäufern waren es dagegen nur 1,2 % ( $p = 0,0017$ ).

Auch die Betrachtung einzelner *Borrelia*-Genospezies ergab, je nach Zeckenherkunft, signifikante Unterschiede. So zeigten Vogelzecken generell eine deutlich größere Diversität und höhere Prävalenzen von *Borrelia*-OspA-Typen als Zecken von Kleinsäufern oder Freilandzecken (Abb. 19). Beispielsweise waren je 4,4 % der Larven von Vögeln mit *B. burgdorferi* bzw. *B. valaisiana* Subtyp I infiziert, bei den Kleinsäufern dagegen keine ( $p = 0,0087$ ). Auch die *B. garinii*-OspA-Typen 6 und 8 wurden nicht in Larven von Kleinsäufern ( $p = 0,00035$  bzw. 0,043) oder wirtssuchenden Nymphen ( $p = 0,020$  bzw.  $p = 0,09$ ) gefunden, jedoch in 7,4 % bzw. 2,9 % der Larven von Vögeln. Bei den anderen Genospezies waren ähnliche, wenn auch keine statistisch signifikanten Trends zu erkennen.

Der Vergleich der Anteile mit positiven Zecken befallener Individuen in Bezug auf einzelne *Borrelia* ssp. ergab ähnliche Resultate (Abb. 20). Statistische Signifikanz wurde bei den

*B. garinii*-OspA-Typen 6 und 8 sowie *B. valaisiana* Subtyp I nachgewiesen. So trugen insgesamt 14,8 % bzw. 6,6 % der Vögel mit den OspA-Typen 6 und 8 infizierte Zecken, Kleinsäuger dagegen gar keine ( $p = 0,000005$  bzw.  $0,0048$ ). Auch mit *B. valaisiana* Subtyp I infizierte Zecken wurden nicht an Kleinsäufern, jedoch an 4,9 % der Vögel gefunden ( $p = 0,019$ ). Bezieht man ausschließlich die positiven Larven ein, so bestätigt sich die statistische Signifikanz nur für *B. garinii* OspA Typ 6 (4,9 %,  $p = 0,019$ ).

#### 4.6.2 Emerging Pathogens

Auch in der Prävalenz der sogenannten „neu aufgetretenen“ zeckenassoziierten Erreger wurden teils deutliche Unterschiede zwischen den Wirtsgruppen bzw. freilandgefangenen Zecken festgestellt (Abb. 19). Die Prävalenz von *A. phagocytophilum* war in allen drei Gruppen gering. Wesentlich unterscheidet sich bei diesem Erreger die Prävalenz in Vogelzecken (2,8 %) von der in Freilandzecken (0,0 %,  $p = 0,019$ ). Betrachtet man nur von Vögeln entnommene Larven und die Nymphen aus dem Freiland, so sind die *Anaplasma*-Gesamtprävalenzen zwar ebenfalls verschieden (2,9 % bzw. 0,0 %), jedoch ist hier, aufgrund der geringeren Gesamtanzahl der Larven von Vögeln, auf einem Niveau von  $\alpha = 0,05$  keine statistische Signifikanz mehr gegeben ( $p = 0,087$ ).

Bei den SFG-Rickettsien fällt auf, dass bei wirtssuchende Zecken, sowohl insgesamt (4,1 %) als auch bei einzelner Betrachtung der Nymphen (3,7 %), die höchsten Prävalenzen nachgewiesen wurden. Im Gegensatz dazu waren die Vogelzecken in ihrer Gesamtheit nur zu 1,9 % mit Rickettsien infiziert, Larven von Vögeln überhaupt nicht. Auch Zecken von Kleinsäufern zeigten ähnlich geringe *Rickettsia* spp.-Prävalenzen von 1,8 % (Gesamt) bzw. 1,9 % (nur Larven). Allerdings konnten die wirtsspezifischen Unterschiede statistisch nicht belegt werden ( $p > 0,05$ ). *Rickettsia monacensis* trat nur in zwei an Vögeln parasitierenden Nymphen auf, nicht jedoch in Larven. Aus diesem Grund wurden nur die Prävalenzen von *R. helvetica* verglichen, jedoch ebenfalls ohne signifikante Unterschiede.

Im Kontrast dazu unterschied sich die Gesamtprävalenz von Babesien zwischen Zecken von Vögeln (11,8 %) und von Kleinsäufern (6,6 %) signifikant ( $p = 0,032$ ). Noch deutlicher stellt sich die Situation beim Vergleich der Larven in beiden Wirtsgruppen dar (17,6 % bzw. 5,4 %,  $p = 0,0022$ ). Auch im Freiland war die Gesamtprävalenz mit 10,7 % höher als bei Zecken von Kleinsäufern, wenngleich auch nur der Vergleich der subadulten Freilandzecken (12,3 %) mit Larven von Kleinsäufern eine statistische Signifikanz ergab ( $p = 0,01$ ).

Ebenso waren Unterschiede in den Prävalenzen von großen und kleinen *Babesia* spp. erkennbar. So war beispielsweise die nicht transovariell übertragbare Spezies *Ba. microti*

in Larven von Kleinsäufern (2,7 %) deutlich weniger häufig als in Nymphen aus dem Freiland (6,8 %,  $p = 0,04$ ). Auch Larven von Vögeln (5,9 %) zeigten eine höhere Prävalenz dieser Spezies als Larven von Kleinsäufern. Dieser Unterschied ist jedoch aufgrund der geringeren Anzahl an Larven bei Vögeln nicht signifikant ( $p = 0,18$ ). *Babesia divergens* wurde deutlich häufiger in Vogelzecken (7,6 %) als in Kleinsäugerzecken (3,7 %) gefunden ( $p = 0,046$ ). Dies galt auch für die separate Gegenüberstellung der Prävalenzen dieser Spezies in parasitierenden Larven (11,8 % bzw. 2,7 %,  $p = 0,045$ ).

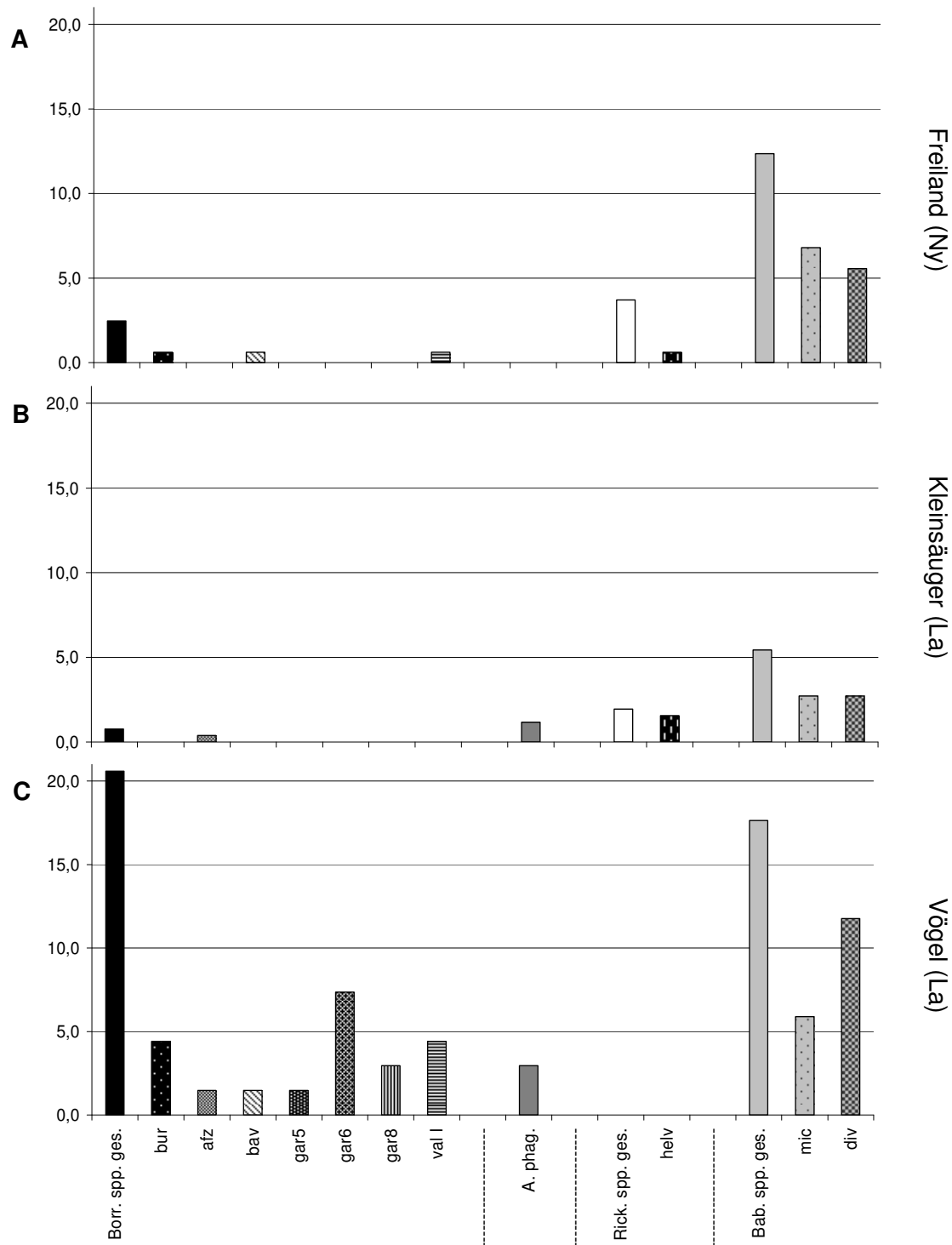
Des Weiteren fällt auf, dass mehr Vogelzecken mit *Ba. divergens* infiziert waren als mit *Ba. microti*, während bei Zecken von Kleinsäufern und Freilandzecken das Verhältnis zwischen beiden Spezies ausgewogen ist. Fisher's Exakter Test ergab hier jedoch weder für subadulte Stadien, noch im Gesamtvergleich eine Signifikanz.

Vergleicht man nun das Vorkommen der Erreger in Bezug auf die Anzahl von Wirtstieren mit positiven Zecken (Abb. 20), so sind bei *A. phagocytophilum* und *Rickettsia* spp. zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen Vögeln und Kleinsäufern, dafür aber gewisse Tendenzen festzustellen: 6,6 % der Vögel trugen mindestens eine *Anaplasma*-infizierte Zecke, dagegen waren es bei den Kleinsäufern nur 1,8 %, alle infestiert mit positiven Larven. Bei Vögeln lag der Anteil an Individuen mit *Anaplasma*-positiven Larven bei 3,3 %.

Die Anteile an Individuen mit *Rickettsia*-positiven Zecken waren dagegen sehr ähnlich. So waren insgesamt 3,3 % der Vögel und 3,0 % der Kleinsäuger mit *Rickettsia*-infizierten Zecken befallen, wobei die Positiven bei den Vögeln ausschließlich Nymphen, bei den Kleinsäufern dagegen Larven waren.

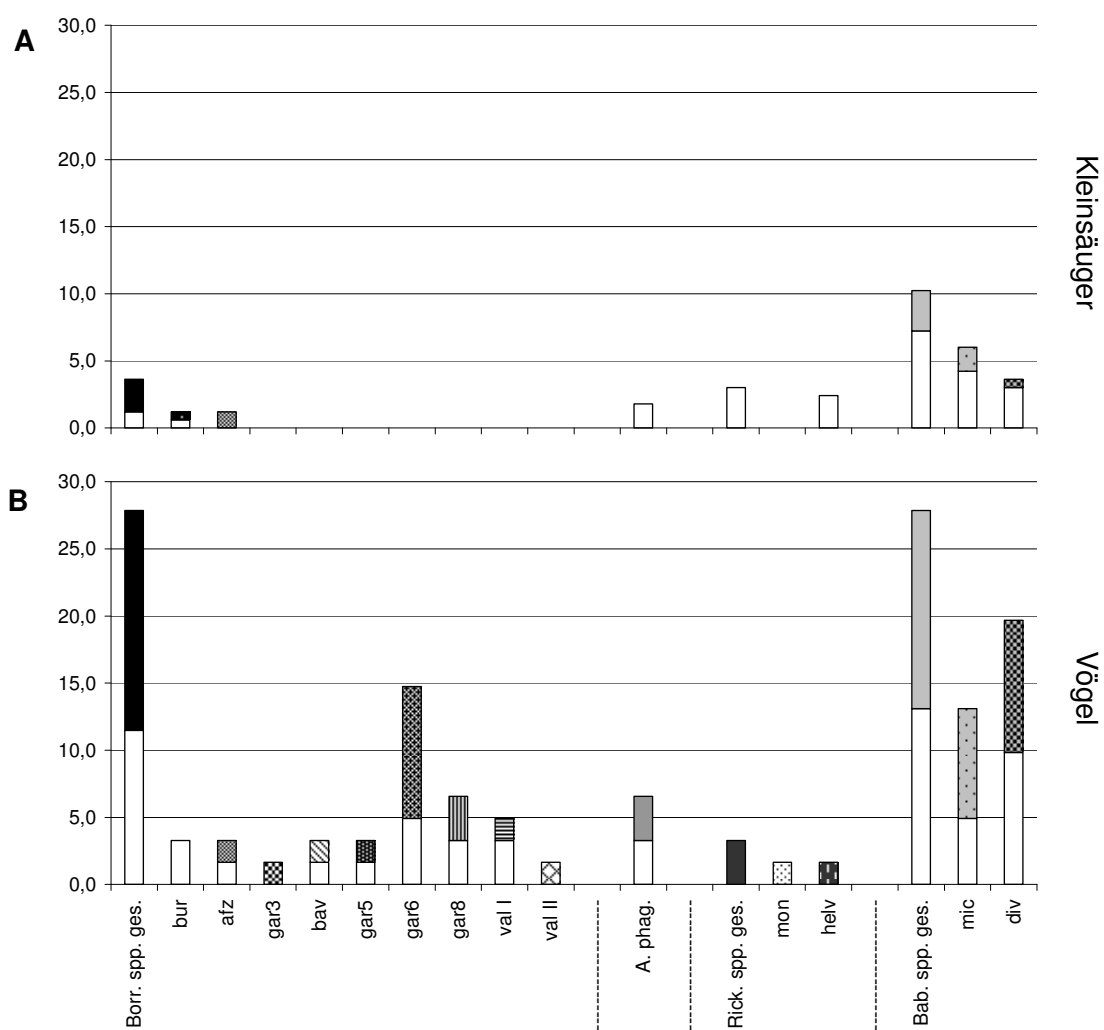
Deutlicher stellen sich die Unterschiede bei den Babesien dar. Mehr als ein Viertel der Vögel (27,9 %) trug *Babesia*-infizierte Zecken, bei den Kleinsäufern waren es 10,2 % ( $p = 0,0015$ ). Am deutlichsten sind die Unterschiede bei großen Babesien. 19,7 % der Vögel und nur 3,6 % der Kleinsäuger waren mit *Ba. divergens*-infizierten Zecken befallen ( $p = 0,0003$ ). Vergleicht man nur die Individuen, die Larven trugen, welche mit dieser Spezies befallen waren, so stellt sich die Situation ähnlich dar, wenngleich der Unterschied weniger deutlich ist (9,8 % bzw. 3,9 %,  $p = 0,044$ ).

Vögel (13,1 %) waren außerdem doppelt so häufig wie Kleinsäuger (6,0 %) mit Zecken infestiert, in denen kleine Babesien nachgewiesen wurden. Bei der Infestation mit positiven Larven sind die Werte jedoch annähernd gleich (4,9 % bzw. 4,2 %), was sich insgesamt für *Ba. microti* nicht in einem statistisch signifikanten Unterschied äußert ( $p = 0,074$ ).



**Abb. 19 Vergleich der Prävalenzen zeckenassoziierter Erreger in subadulten Stadien von *I. ricinus* verschiedenen Ursprungs innerhalb eines Untersuchungsgebietes**

Es sind die Prävalenzen (%) von 162 freilandgefangenen Nymphen (A), 258 Larven von Kleinsäugetieren (B) und 68 Larven von Vögeln (C) aus Reifenstein gegenübergestellt. Nicht näher charakterisierte Spezies sind in der jeweiligen Gesamtprävalenz enthalten. Borr. spp. ges.–Gesamtprävalenz Borrelien, bur–*B. burgdorferi*, afz–*B. afzelii*, bav–*B. bavariensis*, gar5 bis 8–*B. garinii* (OspA Typen 5 bis 8), val I–*B. valaisiana* (Subtyp I), A. phag.–*A. phagocytophilum*, Rick. spp. ges.–Gesamtprävalenz SFG-Rickettsien, helv–*R. helvetica*, Bab. spp. ges.–Gesamtprävalenz Babesien, mic–*Ba. microti*, div–*Ba. divergens*



**Abb. 20 Vergleich von Kleinsäufern und Vögeln aus Reifenstein im Bezug auf deren Infestation mit positiven Zecken**

Es sind alle Individuen von insgesamt 166 Kleinsäufern (A) und 61 Vögeln (B) aus dem Gebiet Reifenstein einbezogen, an denen mindestens eine positive Zecke parasitierte. Die weißen Balken bezeichnen den jeweiligen Anteil der Individuen, an denen positive Larven gefunden wurden. Zusammen mit dem gemusterten Abschnitt ergeben sie den Gesamtanteil. Angaben in Prozent, Borr. spp. ges.–Gesamtprävalenz Borrelien, bur–*B. burgdorferi*, afz–*B. afzelii*, bav–*B. bavariensis*, gar3 bis 8–*B. garinii* (OspA Typen 3 bis 8), val I und II–*B. valaisiana* (Subtypen I und II), A. phag.–*A. phagocytophilum*, Rick. spp. ges.–Gesamtprävalenz SFG-Rickettsien, mon–*R. monacensis*, helv–*R. helvetica*, Bab. spp. ges.–Gesamtprävalenz Babesien, mic–*Ba. microti*, div–*Ba. divergens*

## 5 Diskussion

### 5.1 *Ixodes ricinus* als Vektor

#### 5.1.1 Fangzahlen und Infestation

Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten 160 Vögel mit Zeckenbefall sind am Boden lebenden passerinen Arten zuzuordnen (Kap. 4.2.1, S. 40). Aufgrund der durch ihre Lebensweise bedingten verstärkten Zeckenexposition tragen diese Arten ein höheres Befallsrisiko für *I. ricinus*-Zecken als z.B. baumbewohnende Spezies oder Seevögel. Die Fangzahlen der einzelnen Vogelarten sind recht unterschiedlich, wobei in Deutschland allgemein häufige Spezies wie Amsel oder Rotkehlchen den größten Anteil der Stichprobe ausmachten. Einige Arten wie z.B. die Rotdrossel wurden ausschließlich auf der Greifswalder Oie gefangen. Diese Spezies ist in Deutschland generell nicht heimisch und tritt nur gelegentlich als Durchzügler in Erscheinung.

Auffällig ist, dass manche Arten wie z.B. Zilpzalp, Kohlmeise, Mönchsgrasmücke, Zaunkönig und Heckenbraunelle, die zu den 20 häufigsten Brutvogelarten in Deutschland zählen (SUDFELDT et al. 2008) oder, im Falle des Buchfinken, sogar weitaus häufiger sind als beispielsweise die Amsel, nur einen kleinen Teil der Gesamtindividuenzahl bildeten. Da in der vorliegenden Arbeit nur Tiere mit Zeckenbefall einbezogen wurden, ist anzunehmen, dass diese Arten deutlich seltener mit Zecken infestiert waren als z.B. Drosselarten, welche hier die höchste Infestationsrate aufwiesen (Tab. 12, S. 41).

Ähnliche Ergebnisse erbrachte auch eine frühere Studie im Gebiet Reifenstein (KIPP et al. 2006b). Auch hier waren Drosselarten wie Singdrossel und Amsel zusammen mit Rotkehlchen und Gimpel deutlich häufiger befallen als andere Arten. Obwohl in dieser Untersuchung der Zilpzalp recht häufig gefangen wurde (N = 44), war keines der Tiere mit Zecken infestiert. In einer weiteren Arbeit im gleichen Untersuchungsgebiet waren ebenfalls Drosselarten mit Abstand am häufigsten befallen (KIPP 2008). Außerdem wurde hier festgestellt, dass die Heckenbraunelle fast ausschließlich tote *I. ricinus*-Zecken trug, was auf eine Immunreaktion der Vögel gegen Zeckenantigene schließen lässt. Eine somit entstandene artspezifische Resistenz gegen Zecken wurde bereits bei Kleinsäugetieren beobachtet (DIZIJ und KURTENBACH 1995; HUMAIR et al. 1999; LAWRIE und NUTTALL 2001) und könnte auch eine Ursache für die unterschiedliche Wirtskompetenz der verschiedenen Vogelarten sein.

Wie auch in weiteren Studien, z.T. aus den Untersuchungsgebieten Reifenstein und Greifswalder Oie, festgestellt wurde (KIPP et al. 2006b; KIPP 2008; SPITALSKA et al. 2006;

STERN et al. 2006), bestand der Hauptteil der Vogelzecken (68,9 %) aus Nymphen, was auf eine wichtige Rolle von Vögeln als Wirt für dieses Zeckenstadium schließen lässt (Kap. 4.2.1, S. 40).

In anderen Untersuchungen wurden dagegen häufiger Larven an Vögeln gefunden als Nymphen (COMSTEDT et al. 2006; DUBSKA et al. 2009). Die Verschiebung zu einer überwiegenden Infestation mit Larven ist vermutlich in den lokalen ökologischen Bedingungen begründet, wobei Aussagen ohne detaillierte Kenntnisse der Untersuchungsgebiete, insbesondere der Vegetation, rein spekulativ wären.

Die Tatsache, dass auf der Greifswalder Oie insgesamt nur sechs wirtssuchende Zecken gesammelt werden konnten (Kap. 4.4, S. 56), lässt darauf schließen, dass der überwiegende Teil der parasitierenden Zecken von den Vögeln mitgebracht wurde. Da fast alle gefangenen Vogelspezies Zugvögel oder Teilzieher sind, besteht also die Möglichkeit, dass selbst bei nicht vorhandener Reservoirkompetenz der Vögel infizierte Zecken über weite Distanzen transportiert werden können, die Vögel also als „Covektor“ für Krankheitserreger dienen. Leider sind jedoch die Migrationsmuster von Vögeln hochkomplex und variabel in Abhängigkeit von der Spezies. Sie können sich selbst zwischen einzelnen Populationen unterscheiden, sodass die Verbreitungswege von Pathogenen nur unter großem Aufwand nachvollzogen werden könnten (REED et al. 2003).

Alle untersuchten Kleinsäuger konnten den Arten *Ap. flavicollis* bzw. *M. glareolus* zugeordnet werden<sup>2</sup>, die den Hauptanteil der Kleinsäugerfauna in den Waldgebieten Mitteleuropas bilden und im gleichen Habitat vorkommen (KOTLIK et al. 2006; SIŃSKI et al. 2006a). Die mittleren Infestationsraten der Kleinsäugerarten (*Ap. flavicollis*: 3,5; *M. glareolus*: 2,5) lagen im Bereich der Gesamtinfestationsrate der Vögel (2,5), wobei die Kleinsäuger im Gegensatz zu Vögeln hauptsächlich mit Larven infestiert waren. Ein ähnliches Ergebnis (2,5) ergab eine frühere Untersuchung von Kleinsäufern in Thüringen (FRANKE 2005). Kleinsäuger haben also v.a. für *I. ricinus*-Larven eine Bedeutung als Wirt, was hauptsächlich durch ihre Aktivität in der unteren Krautschicht, in der sich die Larven vornehmlich aufhalten, begründet ist.

Die Unterschiede im Zeckenbefall zwischen beiden Kleinsäugerarten waren signifikant (Kap. 4.3.1, S. 49). Auch in früheren Arbeiten wurden derartige Unterschiede nachgewiesen (KURTENBACH et al. 1995; SIŃSKI et al. 2006a). Eine Erklärung hierfür ist eine erwor-

---

<sup>2</sup> In Einzelfällen wurden auch Spitzmausarten gefangen. Da für die Untersuchung dieser geschützten Arten keine behördliche Genehmigung bestand, wurden die Tiere sofort freigelassen und nicht in die Untersuchungen einbezogen.

bene Resistenz gegen *I. ricinus*-Larven, die nachweislich bei der Rötelmaus, nicht jedoch bei der Gelbhalsmaus auftreten kann (DIZIJ und KURTENBACH 1995; LAWRIE und NUTTALL 2001). Diese These wird durch die Tatsache unterstützt, dass der Anteil an Individuen aus Reifenstein, die ausschließlich Larven mit geringem Saugzustand bzw. gar keine Zecken trugen, bei Rötelmäusen signifikant höher war als bei Gelbhalsmäusen (Kap. 4.3.1, S. 49).

Die Ursachen für die auch in der vorliegenden Arbeit beobachteten Unterschiede in der Aktivität wirtssuchender Zecken können vielfältig sein. Das Vorkommen von Zecken wird hauptsächlich durch das Vorhandensein geeigneter Wirte, die Vegetation sowie die mikroklimatischen Bedingungen beeinflusst (Kap. 2.1.2, S. 4 und Kap. 2.4, S. 21). Es ist davon auszugehen, dass Gebiete mit einer starken Population v.a. großer Säugetiere (z.B. Reh- und Rotwild) auch eine hohe Aktivität von *I. ricinus* aufweisen (GRAY et al. 1999).

Ob dies auch die Ursache für die hohe Abundanz von Zecken im Gebiet Ückeritz ist, kann aufgrund der Vielzahl möglicher Faktoren und deren komplexem Zusammenwirken nicht eindeutig geklärt werden. Jedoch ist dies sehr wahrscheinlich, da alle Proben in den drei Untersuchungsgebieten auf Usedom am gleichen Tag, d.h. weitgehend unter den gleichen Wetterbedingungen gesammelt wurden.

Trotz der geringen Abundanz von *I. ricinus* in Reifenstein war es aus methodischen Gründen (Kap. 3.2.2, S. 28) nicht möglich, ein anderes Gebiet für die Untersuchungen auszuwählen. KIPP (2008) stellte hier eine Zeckendichte von weniger als einer Zecke pro 100 m<sup>2</sup> fest, was die in der vorliegenden Arbeit beobachtete geringe Abundanz bestätigt. Der Grund hierfür ist allerdings unklar, da große Säugetiere in dem Gebiet vorkommen und auch die Vegetation ein ideales Zeckenhabitat darstellt. Die Ursachenfindung für die geringe Zeckendichte in Reifenstein erfordert weitere intensive Studien, die auch die Erfassung mikroklimatischer Daten einschließen.

Für die geringe Anzahl von Freilandzecken auf der Greifswalder Oie dürfte hingegen der Mangel an Säugetierwirten auf dieser Insel die Hauptursache sein. Fünf der sechs dort gefundenen Zecken waren adulte Tiere, was darauf hindeutet, dass sich *I. ricinus* hier im Freiland nicht reproduziert und ein weiteres Indiz dafür ist, dass der Großteil der an Vögeln saugenden subadulten Stadien von den Wirtstieren mitgebracht wurde.

Im Gegensatz dazu bestand der Hauptanteil der wirtssuchenden Zecken in den anderen Gebieten aus Nymphen. Subadulte Stadien sind im Freiland erwartungsgemäß häufiger als Adulti, da sich nur ein geringer Anteil der Nymphen nach erfolgreicher Blutmahlzeit zu einem adulten Tier weiterentwickeln kann (Kap. 2.1.2, S. 4).



### 5.1.2 Gesamtprävalenzen im Vergleich mit Inzidenzen und Seroprävalenzen

Die in dieser Arbeit festgestellten Gesamtprävalenzen zeigen, dass *I. ricinus* in Deutschland eine Vektorfunktion für alle vier Pathogengruppen aufweist. Babesien wurden insgesamt in 8,6 % der Zecken nachgewiesen und waren somit sogar noch etwas häufiger als Borrelien (6,5 %). Dies steht zunächst vermeintlich im Kontrast zur hohen Anzahl an jährlichen LB-Neuerkrankungen in Deutschland (MEHNERT 2005), wohingegen humane Babesieninfektionen in Europa generell sehr selten sind (HUNFELD et al. 2008). Die deutlich unterschiedlichen Inzidenzen dieser Erkrankungen sind jedoch weniger durch die Erregerprävalenzen im Vektor sondern vielmehr durch ihre Pathogenese bedingt. Während die Lyme-Borreliose auch bei immungesunden Menschen aller Altersstufen auftritt, erkranken an der Babesiose ausschließlich stark immunsupprimierte Personen, wobei v.a. Splenektomie-Patienten ein hohes Risiko tragen (HUNFELD und BRADE 2004; HUNFELD et al. 2008).

In Übereinstimmung mit der Gesamtprävalenz von Babesien stehen die Ergebnisse einer früheren Studie, bei der die Prävalenz von Antikörpern gegen *Ba. microti* und *Ba. divergens* in menschlichen Blutproben aus Deutschland untersucht wurde. Hier wurde bei 11,5 % der Personen, die vorher nachweislich von einer Zecke gestochen wurden, eine Antikörperreaktion gegen Babesien festgestellt, in der Vergleichsgruppe waren es dagegen nur 1,7 % (HUNFELD et al. 2002). Obwohl aktuelle Daten über die Seroprävalenz von humanem Anti-*Babesia*-IgG bzw. -IgM in Deutschland fehlen, ist anzunehmen, dass die überwiegende Mehrzahl von Babesieninfektionen, v.a. bei immungesunden Personen, klinisch inapparent verläuft.

Die Inzidenz der LB in Ostdeutschland<sup>3</sup> variiert regional. So lag sie in den Jahren 2002 - 2006 in den in dieser Arbeit einbezogenen Untersuchungsgebieten unter 40, während z.B. im östlichen Brandenburg bis zu 150 Fälle pro 100.000 Einwohnern gemeldet wurden (SEEDAT et al. 2007). Die im deutschlandweiten Vergleich geringe Borrelienprävalenz in den untersuchten Gebieten (vgl. Kap. 5.2.1.3, S. 79) korreliert also mit den dort festgestellten Inzidenzen.

Geringere Prävalenzen als bei Babesien und Borrelien wurden bei SFG-Rickettsien (4,8 %) und Anaplasmen (1,5 %) beobachtet. Auch humane Rickettsiosen wurden in Deutschland bislang nur in Einzelfällen beschrieben, was zum Teil im schwierigen Erregernachweis in Patientenmaterial begründet ist (DOBLER und WÖLFEL 2009). Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Gesamtprävalenz von SFG-Rickettsien deckt sich mit einer Studie in Baden-Württemberg, wonach bei 4,9 % der Patienten mit Fieber nach

---

<sup>3</sup> Eine Meldepflicht für die LB besteht nur in den neuen Bundesländern.

einem Zeckenstich ein erhöhter Antikörpertiter gegen Erreger dieser Gruppe beobachtet wurde (DOBLER und WÖLFEL 2009). Aus der Arbeit von DOBLER und WÖLFEL (2009) ist jedoch nicht erkenntlich, von welchen *Rickettsia* spp. die eingesetzten Antigene stammen. Bei einer früheren Untersuchung von Seren von Waldarbeitern aus Brandenburg, lag die Seroprävalenz bei 13,7 % (TALASKA 2004). Zwar wurden hier fast ausschließlich Antikörper gegen *R. helvetica* nachgewiesen, jedoch geht aus dieser Publikation nicht hervor, ob die Seren überhaupt auch auf *R. monacensis*-spezifisches IgG untersucht wurden.

Infektionen mit HGA-Erregern sind in Deutschland ebenfalls rar. Bislang wurden europaweit weniger als 100 Fälle gemeldet. Die mittlere Seroprävalenz von Antikörpern gegen *A. phagocytophilum* beim Menschen liegt in Europa bei 6,2 %, wobei sie regional bis zu 21 % betragen kann (DUMLER et al. 2005). In einer Langzeitstudie in Berlin/Brandenburg von 1994 - 2001 wurde bei Personen mit Zeckenstich eine Seroprävalenz von 4,2 % festgestellt, in der Kontrollgruppe waren es nur 1,2 % (KOWALSKI et al. 2006). In dieser Untersuchung wurde außerdem ein Anstieg der Seroprävalenz in den Jahren 1998 - 2001 (8,7 %) gegenüber den Jahren 1994 - 1997 (2,2 %) nachgewiesen. Aktuelle seroepidemiologische Daten von HGA-Infektionen in Deutschland fehlen, aufgrund der festgestellten Gesamtprävalenz von *A. phagocytophilum* ist aber zu erwarten, dass die Seroprävalenz zumindest in den Untersuchungsgebieten der vorliegenden Arbeit im Rahmen des europäischen Durchschnitts liegt.

Weitaus höher ist die Seroprävalenz von Antikörpern gegen *A. phagocytophilum* bei Hunden. In einer deutschlandweiten Studie waren 43,2 % der Hunde seroreaktiv gegen Anaplasmen, wobei nur rund die Hälfte klinisch auffällig war (JENSEN et al. 2007). Die Ursache für diesen hohen Wert liegt vermutlich in der erhöhten Zeckenexposition und somit höheren Infestation von Hunden im Gegensatz zum Menschen.

Neben dem IFT wurde bei einigen Studien (z.B. HUNFELD et al. 2002, KOWALSKI et al. 2006) auch ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) als serologische Nachweismethode verwendet. Die ELISA-Methode ist zwar aufgrund der Möglichkeit einer Automatisierung weniger subjektiv als Immunfluoreszenstests und liefert daher oft geringere Prävalenzen, jedoch ist der IFT sensitiver, da hier mit viel kleineren Serummengen gearbeitet werden kann (HUNFELD et al. 2008). Der Vergleich der Daten ist daher immer unter dem Vorbehalt möglicher methodisch bedingter Differenzen zu betrachten.

## 5.2 Pathogene in Zecken verschiedenen Ursprungs

### 5.2.1 *Borrelia* spp.

#### 5.2.1.1 Vögel

Die molekularbiologische Untersuchung der Zeckenproben ergab, dass Vogelzecken (14,7 %) deutlich häufiger mit Borrelien der LB-Gruppe infiziert waren als Zecken von Kleinsäugetieren (2,6 %) oder wirtssuchende Zecken (3,7 %). Larven von Vögeln trugen signifikant häufiger *Borrelia*-spezifische DNA als Nymphen, was bestätigt, dass Vögel ein wichtiges Reservoir für diese Erregergruppe sind. Die Ursache für die höhere Prävalenz in Larven ist unklar. Eine frühere Arbeit im Untersuchungsgebiet Reifstein zeigte nur eine geringfügig höhere Infektionsrate der Erreger in Larven (KIPP 2008), andere Studien wiederum zeigten ein deutlich gegenteiliges Verhältnis (COMSTEDT et al. 2006; DUBSKA et al. 2009; HANINCOVÁ et al. 2003b).

Die Gesamtprävalenz von Borrelien in Vogelzecken (14,7 %) war geringer als in anderen Untersuchungen in den gleichen Gebieten (Reifstein: 25 %; Greifswalder Oie: 27,6 %) (KIPP et al. 2006b; STERN et al. 2006). Sie liegt aber im mitteleuropäischen Vergleich etwa im mittleren Bereich. So wurde beispielsweise bei Vogelzecken aus Thüringen eine Borrelienprävalenz von 19,4 % nachgewiesen (KIPP 2008), in einer großangelegten Untersuchung in Westpolen war sie mit 27,4 % noch höher (DUBSKA et al. 2009). Im Kontrast dazu wurden in einer weiteren Großstudie in Südschweden nur in 1,4 % der Vogelzecken LB-Erreger gefunden (COMSTEDT et al. 2006). In Europa zeigt sich hier also eine hohe Variabilität, die hauptsächlich von den untersuchten Vogelarten, v.a. hinsichtlich ihres bevorzugten Lebensraums, abhängt. Es wird deutlich, dass vornehmlich bodenbewohnende Vogelarten mit *Borrelia*-infizierten Zecken befallen sind, die generell eine höhere Infestationsrate aufweisen (COMSTEDT et al. 2006; SPITALSKA et al. 2006). Wie die vorgelegten Ergebnisse zeigen, sind hier v.a. Drosselarten, wie Amsel, Rot- und Singdrossel, aber auch Rotkehlchen zu nennen (Tab. 13, S. 44), was auch in anderen Untersuchungen bestätigt wurde (COMSTEDT et al. 2006; DUBSKA et al. 2009; HANINCOVÁ et al. 2003b; KIPP et al. 2006b; KIPP 2008; OLSEN et al. 1995b). Amseln scheinen eine besonders hohe Reservoirkompetenz für diese Erregergruppe zu haben, denn 40 % der untersuchten Tiere trugen *Borrelia*-infizierte Zecken, wohingegen es beim Rotkehlchen nur 14,3 % waren.

Insgesamt wurde in Vogelzecken ein breites Spektrum an OspA-Typen gefunden (Abb. 12, S. 42). Besonders überraschend war der hohe Anteil von *B. afzelii* (OspA Typ 2), einer Spezies, von der man bislang annahm, sie sei ausschließlich mit Kleinsäugetieren assoziiert

(HANINCOVÁ et al. 2003a; HUMAIR et al. 1999). Diese Genospezies wurde, wenn auch mit niedrigeren Prävalenzen, auch in anderen Untersuchungen in Vogelzecken gefunden (COMSTEDT et al. 2006; KIPP et al. 2006b; TARAGEL'OVÁ et al. 2008), darunter auch in Larven (DUBSKA et al. 2009; OLSEN et al. 1995a; POUPON et al. 2006).

Sechs der 13 *B. afzelii*-infizierten Vogelzecken waren Nymphen, sodass zumindest bei diesen Proben nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie bereits vor dem Saugakt am Vogel mit dieser Spezies infiziert waren. Bei der Mehrzahl der anderen Proben kann eine vorherige Infektion oder Cofeeding weitgehend ausgeschlossen werden, da es sich um Larven handelt und keine weiteren *B. afzelii*-infizierten Zecken an den Vögel parasitierten.

An freilebenden Tieren kann Cofeeding als Infektionsweg zwar nie gänzlich außer Acht gelassen werden, da sie vor dem Fang mit weiteren infizierten Zecken befallen gewesen sein könnten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits abgefallen waren, doch ist der Zeitrahmen, in dem eine Transmission durch Cofeeding stattfinden kann aufgrund der Wachstumskinetik der Borrelien während des Saugaktes nur kurz (HODZIC et al. 2002). Bei Wirtstieren, die eine Immunität gegen ein bestimmtes Pathogen aufweisen, ist die Übertragungsrate auf diesem Weg zudem deutlich geringer als bei reservoirkompetenten Tieren (LEVIN und FISH 2000b).

Vor dem Hintergrund, dass die Wahrscheinlichkeit einer transvariellen Übertragung von Borrelien in *I. ricinus* nahezu bei Null liegt (MATUSCHKA et al. 1992; ZHIOUA et al. 1994), muss daher davon ausgegangen werden, dass diese Genospezies zumindest in diesen Fällen von Vögeln auf Zecken übertragen worden ist. Die Tatsache, dass gelegentlich in *B. afzelii*-infizierten Freilandzecken auch Vogel-DNA gefunden wurde, unterstützt diese Annahme (ESTRADA-PENA et al. 2005; PICHON et al. 2005; PICHON et al. 2006). Auch eine Kreuzkontamination der Proben kann ausgeschlossen werden, da die Infektionen in verschiedenen Ansätzen auftraten und *B. afzelii* nicht als Positivkontrolle verwendet wurde.

Der überwiegende Teil der *B. afzelii*-infizierten Vogelzecken stammt von der Greifswalder Oie, einer Insel mit außergewöhnlichen Lebensbedingungen für *I. ricinus*, v.a. wegen der geringen Abundanz und Diversität von Säugetierwirten. Auch in einer früheren Studie wurde *B. afzelii* auf der Greifswalder Oie in einer geringen Anzahl (2,8 %) der Vogelzecken nachgewiesen (STERN et al. 2006). Elf der 13 Vogelzecken, bei denen *B. afzelii* nachgewiesen wurde, parasitierten an Rotkehlchen und Rotdrosseln, zwei Arten, die in Reifenstein nur selten bzw. gar nicht gefangen wurden, auf der Greifswalder Oie dagegen häufig waren. Dies könnte ein Grund für die unterschiedliche Prävalenz von *B. afzelii* in beiden Untersuchungsgebieten sein und weist darauf hin, dass v.a. diese Vogelarten reservoirkompetent für *B. afzelii* sind.

Die naheliegende Frage, ob als Ursache für den hohen Anteil von *B. afzelii* das besondere Wirtsspektrum auf der Greifswalder Oie eine Rolle spielt, kann durch die eigenen Untersuchungen nicht beantwortet werden. Es wird zwar angenommen, dass der Großteil der untersuchten Zecken bereits vor der Ankunft auf der Insel an den Zugvögeln parasitierte (Kap. 5.1.1, S. 70), dennoch kann eine Übertragung von anderen Wirten, zumindest bei den *B. afzelii*-infizierten Nymphen, nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Weitergehende Studien mit größeren Individuenzahlen, insbesondere von Rotkehlchen und Rotdrosseln, sowie umfangreichen genetischen Analysen gewonnener *B. afzelii*-Isolate sind daher erforderlich. Des Weiteren sollten auch die auf der Greifswalder Oie vorkommenden Säugetierarten und an ihnen parasitierende Zecken auf Borrelien untersucht werden.

Es ist bekannt, dass Unterschiede in der Erp- und CRASP-vermittelten Resistenz gegen Wirtskomplement (Kap. 2.2.2, S. 9) eine Schlüsselrolle für die Wirtsspezifität verschiedener LB-Genospezies spielen (KURTENBACH et al. 2002b; SKOTARCZAK 2009). In den beobachteten Fällen muss *B. afzelii* daher resistent gegen das Komplement bestimmter Vogelarten (v.a. Rotdrosseln und Rotkehlchen) gewesen sein. Dennoch wären Aussagen über die Ursachen für diese ungewöhnliche Beobachtung ohne weitere ausgedehnte Untersuchungen, rein spekulativ.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals auch die ebenfalls kleinsäugerassoziierte Spezies *B. bavariensis* in Vogelzecken nachgewiesen, jedoch mit einer weitaus geringeren Prävalenz als *B. afzelii* (Abb. 12, S. 42). Obwohl auch eine Larve mit *B. bavariensis* infiziert war, kann aufgrund der geringen Anzahl an Positiven nicht zwangsläufig auf eine Reservoirfunktion von Vögeln für diese Spezies geschlossen werden.

Neben den erwartungsgemäß hohen Anteilen der *B. garinii*-OspA Typen 6 und 8 wurden andere vogelassoziierte *Borrelia* Spezies wie *B. valaisiana* und weitere *B. garinii*-OspA Typen eher selten bzw. gar nicht in Vogelzecken nachgewiesen. In einer früheren Untersuchung im Gebiet Reifenstein waren die OspA Typen 3, 5, und 7 ebenso selten, die beiden *B. valaisiana*-Subtypen wurden jedoch viel häufiger als in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen (KIPP 2008). *Borrelia garinii* OspA Typ 8 wurde in dieser Untersuchung nicht gefunden. Es liegt nahe, dass bei KIPP (2008) das Fehlen von OspA Typ 8 methodisch bedingt ist, da hier eine RFLP-Methode angewendet wurde, bei der noch nicht zwischen den OspA Typen 6 und 8 unterschieden werden konnte.

Die mit beiden Wirtsgruppen assoziierte Spezies *B. burgdorferi* wurde weniger als halb so oft wie *B. afzelii* nachgewiesen (Abb. 12, S. 42). Während Vögel in Nordamerika kompetente Reservoirs für diese Art sind (GINSBERG et al. 2005; JORDAN et al. 2009),

wurde sie in Europa nur selten in Vogelzecken gefunden, oft sogar seltener als *B. afzelii* (COMSTEDT et al. 2006; DUBSKA et al. 2009; KIPP et al. 2006b; KIPP 2008; TARAGEL'OVÁ et al. 2008). Das bedeutet jedoch nicht unbedingt, dass europäische Vogelarten relativ inkompetente Reservoirs für *B. burgdorferi* sind, denn diese Spezies ist generell in vielen Regionen Europas rar (BURRI et al. 2007; GASSNER et al. 2008; HANINCOVÁ et al. 2003b; JUNTILA et al. 1999; KIPP et al. 2006b; KURTENBACH et al. 2001; SMETANOVA et al. 2007).

Bei der Betrachtung der Anteile bestimmter *Borrelia*-Genospezies an der Gesamtprävalenz in Vogelzecken darf der relative hohe Anteil (18,6 %) nicht identifizierter OspA-Fragmente nicht außer Acht gelassen werden. Bei diesen Proben handelte es sich zwar laut Sequenz- bzw. RFLP-Analyse eindeutig um *Borrelia*-spezifische Fragmente, jedoch war eine genaue Charakterisierung aufgrund zu kurzer bzw. lückenhafter Fragmente oder einer zu geringen DNA Menge nicht möglich. Dennoch erlauben die vorgelegten Ergebnisse zwei grundlegende Aussagen: Zum einen sind Vögel, v.a. Amseln, kompetente Reservoirs für ein breites Spektrum von *Borrelia*-Genospezies. Zum anderen zeigte der Vergleich mit früheren Studien (KIPP et al. 2006b; KIPP 2008; STERN et al. 2006), dass dieses Spektrum selbst innerhalb der Untersuchungsgebiete großen Schwankungen unterworfen ist.

#### 5.2.1.2 Kleinsäuger

Die geringe Gesamtprävalenz (2,6 %) von Borrelien in Zecken von Kleinsäugetieren zeigt, dass die bisherige Annahme, Mäuse und Wühlmäuse seien ein wichtiges Reservoir für Borrelien, neu diskutiert werden muss. Der überwiegende Teil der *Borrelia*-Infektionen wurde zudem in Nymphen und Adulten nachgewiesen (30,8 % bzw. 50,0 %), und Larven waren nur zu 0,8 % infiziert, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein Großteil der positiven Zecken bereits vor dem Saugakt am Nagetier infiziert war. Die Anzahl von mit *Borrelia*-positiven subadulten *I. ricinus*-Zecken befallenen Tieren war zudem mit 3,6 % deutlich kleiner als bei Vögeln (23,8 %), was die These zulässt, dass Kleinsäuger eine wesentlich geringere Bedeutung als Reservoir für Borrelien haben.

Hinsichtlich der Prävalenz von *Borrelia* spp. in Kleinsäugerzecken liefert die Literatur recht unterschiedliche Ergebnisse. Es fällt auf, dass ältere Studien, in denen noch der Immunfluoreszenztest (IFT) als Nachweisverfahren angewendet wurde, höhere Prävalenzen liefern als Untersuchungen, die mit modernen molekularbiologischen Verfahren durchgeführt wurden. So wurden in Polen mittels IFT Prävalenzen in parasitierenden Larven von 13,5 % bis 20,0 % festgestellt (MICHALIK et al. 2003). Eine Arbeitsgruppe aus der Schweiz kam mit der gleichen Methode auf einen Wert von 14 % bei gesogenen Larven und 50 % bei Nymphen (HUMAIR et al. 1993). Modernere PCR-

Analysen von an Mäusen gesogenen *I. ricinus* lieferten dagegen nur Werte von 3,0 % in Thüringen (FRANKE 2005) und 5,7 % (*Ap. flavicollis*) bzw. 4,5 % (*M. glareolus*) in Polen (SIŃSKI et al. 2006a). Dies führt zu der Annahme, dass die Screening-Methode einen entscheidenden Einfluss auf die unterschiedlichen Resultate ausgeübt haben könnte. Besonders deutlich wird dies, wenn man alte und neuere Ergebnisse von Studien unserer Arbeitsgruppe im gleichen Untersuchungsgebiet (Bad Berka, Thüringen) vergleicht: Während 1997 mittels IFT noch Prävalenzen zwischen 23,7 % und 55,3 % in Kleinsäugerzecken bestimmt wurden (MESSUTAT 1999), führte eine andere Untersuchung unter Verwendung von PCR zu einem deutlich geringeren Wert von 3,0 % (FRANKE 2005). Trotz dieser gravierenden Tendenzen muss jedoch berücksichtigt werden, dass auch lokale ökologische und klimatische Bedingungen sowie saisonale Schwankungen einen Einfluss auf die Unterschiede in den Prävalenzen haben können.

Es ist bekannt, dass bei serologischen Methoden Kreuzreaktionen der Antikörper mit Antigenen anderer Spirochäten, wie beispielsweise Treponemen, Leptospiren oder Rückfallfieber-Borrelien auftreten können, was zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann (HUMMLER 2001; SCHNEIDER 1995; ŠTEFANČÍKOVÁ et al. 2008). Bei den hochsensitiven molekularbiologischen Methoden mit spezifischen Primern kann dies dagegen weitgehend ausgeschlossen werden, was eine mögliche Erklärung für die geringeren Prävalenzen bei diesen Verfahren ist.

Zwar steht nach xenodiagnostischen Tests außer Frage, dass Kleinsäuger Borrelien auf Zecken übertragen können, doch ist die Reservoirkompetenz der untersuchten Arten, unter Berücksichtigung der vorgelegten Ergebnisse und anderer Arbeiten, weitaus geringer einzuschätzen als bisher angenommen. Bei allen früheren xenodiagnostischen Studien, in denen recht hohe Transmissionsraten festgestellt wurden, war der IFT die Nachweismethode der Wahl (GERN et al. 1994; HUMAIR et al. 1993). Im Gegensatz dazu führte eine xenodiagnostische Analyse mittels PCR nur in 1,3 % der an Kleinsäugern gesogenen, vorher nüchternen Larven zu einem *Borrelia*-positiven Resultat (KURTENBACH et al. 1998b). Obwohl bei rund 19 % der dort eingesetzten Nager eine Borrelieninfektion zweifelsfrei in Hirn- und Nierengewebe nachgewiesen wurde, fand nur bei wenigen Tieren eine Übertragung der Spirochäten auf *I. ricinus*-Larven statt. In einer weiteren Studie war die Übertragungsrate ähnlich niedrig (GRAY et al. 1999).

Auch eine andere Arbeit aus Österreich bestätigte durch die Untersuchung von Herzmuskel-, Harnblasen- und Hirnbiptaten mit 43 % (*Ap. flavicollis*) bzw. 38 % (*M. glareolus*) recht hohe Infektionsraten von Kleinsäugern mit LB-Erregern (KHANAKAH et al. 2006). Bei einer tschechischen Untersuchung, bei der Muskelbiptate von Kleinsäugern analysiert wurden, lag die Prävalenz bei 16,8 % (KYBICOVA et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen in keinem der Ohrbioptate *Borrelia*-spezifische DNA nachgewiesen. In Polen konnten Borrelien in Ohrgewebe nur in 4,3 % (*Ap. flavicollis*) bzw. 1,2 % (*M. glareolus*) festgestellt werden. In Irland war die Prävalenz in Ohrbioptaten von Kleinsäugetern mit 2,4 % ähnlich gering (GRAY et al. 1999). Auch Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit einer nachgewiesenen Infektionsrate von nur 0,9 % bestätigten dies (FRANKE 2005). Es zeigt sich also, dass die Ergebnisse offensichtlich von der Art des untersuchten Gewebes abhängig sind und die Nachweisquote in inneren Organen wie Herz, Niere, Hirn oder Harnblase deutlich höher ist als in Ohrgewebe.

Die Genospeziesdifferenzierung der positiven Amplikons aus gesogenen Zecken erbrachte keine unerwarteten Resultate. So wurden mit *B. afzelii* und *B. burgdorferi* zwei Spezies identifiziert, von denen bekannt ist, dass sie von Mäusen auf Zecken übertragen werden können (HANINCOVÁ et al. 2003a; KURTENBACH et al. 1998b). Im Gegensatz zu Vogel- und Freilandzecken wurde jedoch die vermeintlich kleinsäugerassoziierte Spezies *B. bavariensis* nicht in Zecken der untersuchten Nagerarten gefunden. Allerdings konnten zwei Proben aus bereits beschriebenen Gründen (Kap. 5.2.1.1) nicht näher charakterisiert werden, weshalb eine Infektion dieser Zecken mit anderen Genospezies nicht auszuschließen ist.

Die vorgelegten Ergebnisse der serologischen Untersuchung zeigen, dass rund ein Drittel der Kleinsäuger bereits mit LB-Erregern Kontakt hatte bzw. infiziert ist (Kap. 4.3.3, S. 52.). In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe wurde ein ähnlicher Wert ermittelt (FRANKE 2005). In der Slowakei lag die Seroprävalenz von Kleinnagern zwischen 18,6 % und 43,7 % (ŠTEFANČÍKOVÁ et al. 2004; TRÁVNÍČEK et al. 2003; VOSTAL und ZAKOVSKA 2003), in der Tschechischen Republik zwischen 7,4 % und 24,5 % (KYBICOVA et al. 2008; ZEMAN und JANUSKA 1999). Im Gegensatz zu anderen Studien (FRANDSEN et al. 1995; FRANKE 2005; JURICOVA et al. 2002; PAWEŁCZYK und SIŃSKI 2000; VOSTAL und ZAKOVSKA 2003; ZEMAN und JANUSKA 1999) wurde in der vorliegenden Untersuchung jedoch kein Unterschied in der Seroprävalenz zwischen den beiden Kleinsäugerarten nachgewiesen.

Trotz der größeren Wahrscheinlichkeit einer Borrelieninfektion wurde bei stärker infestierten Tieren im Durchschnitt kein erhöhter IgG-Titer festgestellt (Kap. 4.3.3, S. 52.). Das Fehlen einer solchen Korrelation wurde auch von PAWEŁCZYK und SIŃSKI (2000) bestätigt. Die Tatsache, dass die Seroprävalenz im Frühjahr am geringsten war, lässt sich dadurch erklären, dass bei Tieren, die an Borreliose erkrankt sind eine höhere Mortalität in den Wintermonaten auftritt, sodass im darauf folgenden Frühjahr die Anzahl erkrankter Tiere im Verhältnis zu gesunden kleiner ist und erst im Jahresverlauf wieder ansteigt.



(TÄLLEKLINT und JAENSON 1995). Des Weiteren ist die Wahrscheinlichkeit einer Borrelieninfektion aufgrund der geringen Zeckenaktivität im Winter geringer.

Die meisten Tiere, an denen *Borrelia*-positive Zecken gefunden wurden, zeigten erwartungsgemäß niedrige Antikörpertiter, denn die Infektiosität der Wirtstiere für Zecken korreliert negativ mit der Stärke ihrer Immunantwort (KURTENBACH et al. 1994; KURTENBACH et al. 2002a). Von der Seroprävalenz oder Höhe der Antikörpertiter können also keinesfalls Rückschlüsse auf die Reservoirkompetenz der Tiere gezogen werden. Weitere xenodiagnostische Transmissionsexperimente unter Verwendung moderner molekularbiologischer Methoden sind daher nötig, um den Kenntnisstand über die Reservoirkompetenz verschiedener Kleinsäugerarten weiterzuentwickeln.

#### 5.2.1.3 Wirtssuchende Zecken und Vergleich mit gesogenen Larven

Auch die Freilandzecken zeigten mit 3,7 % im Gegensatz zu den an Vögeln parasitierenden Zecken eine unerwartet geringe Prävalenz von Borrelien der LB-Gruppe (Kap. 4.4.1, S. 57). Die Gesamtprävalenz liegt im unteren Bereich anderer Untersuchungen in Deutschland, in denen Werte von 3,8 % bis 36 % ermittelt wurden (FINGERLE et al. 1999; FRANKE 2005; HILDEBRANDT et al. 2003; KIPP et al. 2006a; KIPP et al. 2006b).

Ungewöhnlich war, dass Adulti aus dem Freiland nur unwesentlich häufiger infiziert waren als Nymphen, obwohl sie aufgrund der höheren Anzahl der Blutmahlzeiten und der damit einhergehenden größeren Infektionswahrscheinlichkeit erwartungsgemäß deutlich höhere Borrelienprävalenzen aufweisen müssten. Das Fehlen signifikanter Unterschiede zwischen adulten und subadulten Zecken kommt hier vor allem dadurch zustande, dass keine *Borrelia*-infizierten adulten Weibchen gefunden wurden, was sich teilweise durch ihre geringe Gesamtzahl erklären lässt.

Im Gebiet Reifenstein wurde mit 5,1 % eine geringere Prävalenz von Borrelien bei Freilandzecken festgestellt als in einer früheren Untersuchung (15,6 %) im selben Gebiet, bei der mit der gleichen Methode gearbeitet wurde (KIPP et al. 2006b). Auch in dieser Studie war die Infektionsrate bei wirtssuchenden Zecken deutlich geringer als die von Vogelzecken (25 %). Zum einen lässt sich dies dadurch erklären, dass an reservorkompetenten Tieren oftmals mehrere infizierte Zecken sitzen. Andererseits wäre es auch möglich, dass eine transstadielle Übertragung der Spirochäten nicht bei allen Zecken stattfindet.

Kleinsäuger waren in Reifenstein deutlich seltener mit *Borrelia*-infizierten subadulten Zecken befallen als Vögel (Abb. 20, S. 67). Neben einer größeren Reservoirkompetenz ist auch die Lebensweise von Vögeln ein wichtiger Faktor für die hohen Borrelien-

prävalenzen. So nehmen die meisten Vogelspezies im Gegensatz zu Kleinsäufern einen weitaus größeren Lebensraum ein. Die Wahrscheinlichkeit der Aufnahme von *Borrelia*-positiven Zecken in benachbarten Habitaten mit höherer Zeckendichte bzw. Erregerprävalenz ist also bei Vögeln um ein Vielfaches höher. Dies erklärt auch das größere Spektrum von *Borrelia* spp. in Vogelzecken.

Die bereits eingehend beschriebene große Heterogenität der Borrelienprävalenzen in Europa, selbst innerhalb einzelner Regionen (Kap. 2.2.1, S. 6), wurde also durch die vorgelegten Ergebnisse bestätigt (Kap. 4.4.1, S. 57). Die Beobachtung, dass in Gebieten mit hoher Zeckendichte die Prävalenz von Borrelien geringer ist, da dort v.a. große Säugetiere ohne Reservoirkompetenz für diese Erreger eine Rolle als Zeckenwirt spielen (GRAY et al. 1999), wurde hingegen in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt.

Zwar wurden keine signifikanten Unterschiede im Spektrum der Genospezies zwischen den einzelnen Untersuchungsgebieten festgestellt, der Vergleich mit anderen Studien aus Deutschland zeigt aber dennoch unterschiedliche Zusammensetzungen. So war der Anteil an *B. burgdorferi* deutlich höher als bei KIPP et al. (2006). Die in den meisten Regionen Europas dominierende Spezies *B. afzelii* (RAUTER und HARTUNG 2005) sowie *B. valaisiana* waren dagegen in der vorliegenden Arbeit in Freilandzecken seltener. Dies ist jedoch nicht ungewöhnlich, denn auch das Artenspektrum von Borrelien ist in Europa einer hohen lokalen und temporären Variabilität unterworfen (KIPP et al. 2006a). Die Ursachen für diese Heterogenität sind äußerst komplex. Wichtige Faktoren sind neben der Abundanz von Wirten und Reservoiren eine Vielzahl weiterer biotischer und abiotischer Parameter (RANDOLPH 2001).

Unerwartet hoch ist mit 7,7 % der Anteil von *B. bavariensis*, einer Spezies, die in Europa bislang nur selten in Zecken nachgewiesen wurde (FRANKE et al. 2008; HU et al. 2001). Der Vergleich von Zecken unterschiedlichen Ursprungs im Gebiet Reifenstein zeigt, dass diese Genospezies zwar in Freiland- und Vogelzecken, nicht jedoch in Zecken von Kleinsäufern gefunden wurde (Abb. 19, S. 66). Die bislang angenommene strikte Assoziation von *B. bavariensis* mit Kleinsäufern muss also neu diskutiert werden.

Auch der Anteil von *B. afzelii* an der Gesamtprävalenz war bei Larven von Vögeln etwas höher als bei an Kleinsäufern parasitierenden Larven. Bei einer Analyse der Blutmahlzeit von *Borrelia*-positiven Freilandzecken in Irland wurde bei knapp der Hälfte der untersuchten Nymphen Vogel-DNA nachgewiesen, wohingegen nur 5 % im vorherigen Stadium an Kleinsäufern gesaugt haben (PICHON et al. 2005). Obwohl *B. afzelii* in dieser Studie bei 19 % der Freilandnymphen gefunden wurde, konnte bei nur einer dieser Zecken Kleinsäuger-DNA nachgewiesen werden, in drei dagegen Singvogel-DNA. Auch diese Ergebnisse zeigen also, dass Kleinsäuger im Vergleich zu Vögeln eine eher

untergeordnete Rolle im Transmissionszyklus von Borrelien, im Speziellen auch von *B. afzelii*, spielen.

Rund ein Viertel der Isolate aus Freilandzecken konnte nicht näher charakterisiert werden, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass Infektionen mit weiteren Spezies auftraten. Generell zeigen die vorgelegten Daten aber, dass Nymphen aus dem Freiland innerhalb des Gebiets Reifstein nicht nur geringere Prävalenzen, sondern auch ein kleineres Spektrum an *Borrelia*-Genospezies aufweisen als Larven von Vögeln. Dies lässt vermuten, dass einige OspA-Typen (z.B. 2, 5, 8) im Vergleich mit anderen Genospezies in geringerem Maße transstadiell im Vektor weitergegeben werden.

## 5.2.2 *Anaplasma phagocytophilum*

### 5.2.2.1 Vögel

Erreger der humanen granulozytären Anaplasmosen wurden im Vergleich zu Borrelien nur in wenigen Vogelzecken gefunden (2,7 %). In dieser Arbeit wurden zwei an Vögeln parasitierende *I. ricinus*-Larven mit einer *A. phagocytophilum*-Infektion festgestellt, was zunächst die Vermutung zulässt, dass die Erreger von den Vögeln aufgenommen wurden, da Anaplasmen nicht transovariell im Zeckenzyklus übertragen werden. Zumindest bei einer Larve kann jedoch Cofeeding nicht ausgeschlossen werden, da am gleichen Vogel eine *Anaplasma*-infizierte Nymphe saß.

Von den vorgelegten Ergebnissen lässt sich also nicht darauf schließen, dass Vögel kompetente Reservoirs für HGA-Erreger sind. Auch in anderen Untersuchungen war die Prävalenz von granulozytären Anaplasmen in Vogelzecken gering, zudem wurden diese Erreger bislang größtenteils in parasitierenden Nymphen festgestellt (ALEKSEEV et al. 2001; BJOERSDORFF et al. 2001), was diese Annahme unterstützt. Bei einer Studie in Polen wurde bei keinem der untersuchten Vögel *Anaplasma*-spezifische DNA nachgewiesen, weder in parasitierenden Zecken noch in Blutproben der Tiere (SKOTARCZAK et al. 2006).

In einer aktuellen Studie in Litauen und Norwegen wurden, je nach Untersuchungsgebiet, recht unterschiedliche Prävalenzen von *A. phagocytophilum* in Vogelzecken ermittelt (PAULASKAS et al. 2009). In dieser Untersuchung wurde *A. phagocytophilum* in einem Gebiet in Norwegen bei 14,3 % der Larven und 10,7 % der parasitierenden Nymphen festgestellt, in einem anderen norwegischen Untersuchungsgebiet dagegen nur bei 1,9 % (La) bzw. 2,0 % (Ny), und in Litauen lag die Prävalenz bei 0 %. In dieser Arbeit wurde

neben der *A. phagocytophilum*-spezifischen PCR auch eine weniger spezifische Methode verwendet, mit dem Ergebnis weitaus höherer Prävalenzen in allen Gebieten. Dies lässt die Vermutung zu, dass Vögel eine Bedeutung als Wirte oder Reservoir für andere *Anaplasma*- oder *Ehrlichia* ssp. haben. Zwar wurden hier verhältnismäßig viele Infektionen bei Larven gefunden, jedoch ist von den Daten nicht erkenntlich, ob die Möglichkeit von Cofeeding bestand, weshalb die Autoren Vögeln nur eine Rolle bei der Verbreitung, nicht jedoch als Reservoir von granulozytären Anaplasmen zusprechen.

Es kann also anhand der vorgelegten Ergebnisse und von Daten aus anderen Studien zumindest eine Funktion als Covektor bestätigt werden, da Zugvögel *A. phagocytophilum*-infizierte Zecken über weite Entfernungen transportieren können.

#### 5.2.2.2 Kleinsäuger

Noch geringer war die Prävalenz von Anaplasmen in Zecken von Kleinsäufern (1,1 %). Jedoch traten alle drei *Anaplasma*-Infektionen in Larven von verschiedenen Tieren auf. Eine Übertragung der Erreger von den Kleinsäufern auf die *I. ricinus*-Larven ist also wahrscheinlich. Eine Arbeitsgruppe aus der Schweiz stellte bei Larven von Kleinsäufern eine Prävalenz von 9,5 % fest, allerdings wurden hier die Zecken in Pools untersucht, weshalb die tatsächliche Prävalenz vermutlich geringer war (LIZ et al. 2000). Auch in Blut-, Leber-, Milz- und Ohrgewebe von Kleinsäufern wurde bereits *A. phagocytophilum*-DNA nachgewiesen (BOWN et al. 2003; LIZ et al. 2000; ŠTEFANČÍKOVÁ et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen in keinem Ohrbiopat eine Infektion mit Anaplasmen festgestellt. Da hier die Prävalenz in Zecken von Kleinsäufern ohnehin gering war, war dies jedoch nicht ungewöhnlich, denn auch LIZ et al (2000) fanden nicht bei allen Tieren, die mit *Anaplasma*-positiven Larven befallen waren, erregerspezifische DNA in Gewebeproben. Außerdem war hier die Nachweisquote in verschiedenen Geweben unterschiedlich hoch. Eine negative Gewebeprobe bedeutet demnach nicht zwangsläufig, dass das untersuchte Tier nicht infiziert ist.

Es ist also wahrscheinlich, dass Kleinsäuger, wenn auch in geringem Maße, als Reservoir für HGA-Erreger fungieren. Die vor diesem Hintergrund unerwartet geringe Infestation von Kleinsäufern mit *A. phagocytophilum*-infizierten Larven ist dadurch zu erklären, dass Anaplasmen bei Kleinsäufern generell nur von kurzer Dauer sind (BEUGNET und MARIE 2009; BOWN et al. 2003) und diese Tiere daher nur eine zeitlich begrenzte Reservoirkompetenz aufweisen können. BEUGNET und MARIE (2009) vermuteten auch, dass Kleinsäuger kein Überwinterungsreservoir für Anaplasmen darstellen. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit alle positiven, an Kleinsäufern gesogenen Larven im Sommer entnommen wurden, unterstützt diese These.

Auch hier ist die spezifische Immunantwort der Kleinsäuger der entscheidende Faktor für die Reservoirkompetenz. Bei einer xenodiagnostischen Studie mit *Ixodes scapularis* und der Weißfußmaus (*Peromyscus leucopus*) wurde herausgefunden, dass bei den meisten Tieren die Immunantwort nach mehrfacher Infektion mit *A. phagocytophilum* eine effiziente Übertragung der Erreger auf sterile Larven verhindert und nur wenige Tiere reservorkompetent waren (LEVIN und FISH 2000b). Im Gegensatz zu nur einmalig infizierten Kleinsäufern (82,5 %) lag die Prävalenz in xenodiagnostischen Larven, die an Tieren saugten, die durch mehrfache Infektion immunisiert worden sind, bei nur 6,3 %. Daneben war auch die Übertragungsrate durch Cofeeding bei immunisierten Mäusen mit nur 30 % bedeutend kleiner als bei der nicht immunisierten Kontrollgruppe (100 %).

Alle *Anaplasma*-Infektionen bei Kleinsäugerproben traten in der vorliegenden Untersuchung bei Larven von Gelbhalsmäusen auf. Untersuchungen aus Großbritannien und der Schweiz zeigten aber, dass Rötelmäuse deutlich häufiger mit Anaplasmen infiziert sind bzw. infizierte Larven tragen als Tiere der Gattung *Apodemus* (BOWN et al. 2003; LIZ et al. 2000). Leider gibt es bislang keine vergleichbaren Arbeiten aus Deutschland, sodass über die Ursache dieser gegensätzlichen Resultate nur spekuliert werden kann. So waren die Unterschiede zwischen beiden Kleinsäugerarten in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant, da die Prävalenz von Anaplasmen hier generell sehr gering war. Weitere Untersuchungen mit größerem Stichprobenumfang könnten demnach die Ergebnisse der früheren Studien bestätigen.

#### 5.2.2.3 Wirtssuchende Zecken und Vergleich mit gesogenen Larven

In wirtssuchenden Zecken wurden Anaplasmen nur im Gebiet Bansin gefunden (2,5 %), was sich insgesamt in einer noch geringeren Prävalenz dieser Erreger im Freiland äußert (0,6 %). Der Vergleich mit früheren Studien zeigt, dass Anaplasmen in Deutschland generell selten in *I. ricinus* zu finden sind. So wurden die höchsten Prävalenzen bislang in Norwegen (14,9 %) und Dänemark (23,6 %) ermittelt (ROSEF et al. 2009; SKARPHEDINSSON et al. 2007). In Deutschland wurden dagegen weitaus geringere Werte festgestellt, von 1 - 2,9 % in Süddeutschland, über 0 - 3,8 % in Thüringen, bis zu 3,9 % in Berlin (HARTELT et al. 2004; HILDEBRANDT et al. 2002; PICHON et al. 2006; SILAGHI et al. 2008a). Die Daten aus der Literatur zeigen also bei *A. phagocytophilum*, ähnlich wie bei Borrelien, ebenfalls eine Variabilität bezüglich ihrer Prävalenz in verschiedenen Gebieten Europas (Kap. 2.3.1.3, S. 13), wobei auch die Ursachen dafür in den gleichen Faktoren zu suchen sind (siehe Kap. 5.2.1.3).

Vergleicht man die *Anaplasma*-Prävalenzen in Zecken verschiedenen Ursprungs innerhalb des Gebietes Reifenstein, so fällt auf, dass HGA-Erreger zwar in Larven von Vögeln und Kleinsäugetern, nicht jedoch in Zecken aus dem Freiland gefunden wurden. Dies mag zum einen an der geringen Gesamtprävalenz dieser Erreger liegen, zum anderen besteht aber auch die Möglichkeit, dass *A. phagocytophilum* im Zeckenzyklus nicht in jedem Fall transstadiell übertragen wird. Um dies zu untersuchen sind also weitere Freilandstudien mit einer höheren Stichprobenzahl sowie Laborexperimente mit infizierten Larven notwendig.

### 5.2.3 *Rickettsia* spp.

#### 5.2.3.1 Vögel

Rickettsien der SFG wurden in 4,5 % der untersuchten Vogelzecken nachgewiesen und waren damit etwas häufiger als Anaplasmen. Zwar wurden Rickettsien bereits in den 1960er Jahren in Vogelzecken gefunden (CLIFFORD et al. 1969), aktuelle Prävalenzstudien über *Rickettsia* spp. in an Vögeln parasitierenden Zecken sind aber rar und meist wurden nur andere Zeckenarten als *I. ricinus* untersucht (IOANNOU et al. 2009).

In einer Studie aus den Karpaten wurde nur bei einer *I. ricinus*-Nymphe von einem Rotkehlchen eine *Rickettsia* spp.-spezifische DNA nachgewiesen (SPITALSKA et al. 2006). Eine Arbeitsgruppe aus Schweden stellte in einer aktuellen Untersuchung eine Prävalenz von 11,3 % bei Zecken von Zugvögeln fest (ELFVING et al. 2010). Die meisten DNA-Fragmente konnten in dieser Arbeit als *R. helvetica* identifiziert werden (67 %), der einzigen in Schweden auftretenden SFG-Spezies. Andere *Rickettsia* ssp., darunter auch *R. monacensis* (13,8 %) wurden hier seltener nachgewiesen.

Die vorgelegten Ergebnisse stellen den ersten Nachweis von SFG-Rickettsien bei an Vögeln parasitierenden *I. ricinus* in Mitteleuropa dar. Im Gegensatz zur Arbeit von ELFVING et al. (2010) wurden hier jedoch die meisten Amplikons als *R. monacensis* und nur zwei Proben als *R. helvetica* identifiziert (Tab. 16, S. 47). Allerdings wurden acht Fragmente nicht näher charakterisiert, weshalb diese Verteilung nicht absolut ist. Auch unter Berücksichtigung dieser Proben wäre jedoch *R. monacensis* in Relation zu anderen Spezies häufiger als in Vogelzecken aus Schweden.

Die meisten *Rickettsia*-infizierten Vogelzecken wurden im Frühjahr auf der Greifswalder Oie gefunden. Dies könnte auch eine Erklärung für den hohen Anteil von *R. monacensis* sein, denn der Großteil der dort gefangenen Vögel nutzte die Insel zu dieser Zeit als

Rastplatz auf ihrem Zug von verschiedenen Regionen Süd- und Südwesteuropas, wo diese Spezies als Verursacher des Mittelmeerfleckfiebers auftritt (JADO et al. 2007; MARQUEZ 2008), nach Norden. Als am häufigsten mit *Rickettsia*-infizierten Zecken befallene Spezies (21,1 %) ist hier als Beispiel die Rotdrossel zu nennen. Neben Rotkehlchen und Kohlmeise scheinen v.a. Vögel der Gattung *Turdus* eine Rolle bei der Verbreitung von Rickettsien zu spielen, was durch die Ergebnisse von ELFVING et al. (2010) bestätigt wird.

Die Tatsache, dass alle *Rickettsia*-positiven Vogelzecken in Reifenstein im Frühjahr auftraten lässt ebenfalls vermuten, dass die Tiere die infizierten Zecken aus ihren Überwinterungsgebieten mitgebracht haben. Da es sich hier aber ausschließlich um Amseln handelt und diese Art als Teilzieher beschrieben wird, kann dies nicht mit Sicherheit bestätigt werden.

Zwar waren zwei Vögel mit mehreren *Rickettsia*-infizierten Zecken befallen, doch könnte dies auch ein Ergebnis von Cofeeding sein. Da Rickettsien im Zeckenzyklus transovariell übertragen werden und *I. ricinus* somit als Erregerreservoir dient, kann von der Anzahl infizierter Larven nicht zwangsläufig auf eine Reservoirkompetenz von Vögeln geschlossen werden (RAOULT und ROUX 1997). Wie auch von ELFVING et al. (2010) und IOANNOU et al. (2009) angenommen, kann aber anhand der vorgelegten Ergebnisse eine wichtige Rolle, v.a. von Zugvögeln, für die Verbreitung von Erregern der SFG festgestellt werden, sodass ursprünglich nicht in Mittel- und Nordeuropa vorkommende Erreger wie *R. monacensis* in diese Regionen eingetragen werden können.

#### 5.2.3.2 Kleinsäuger

Auch zur Rolle von Kleinnagern im Transmissionszyklus von Rickettsien gibt es bislang kaum Untersuchungen, somit wurden diese Erreger in der vorliegenden Arbeit erstmals in Kleinsäugerzecken in Deutschland nachgewiesen. Nur in wenigen an Kleinsäufern parasitierenden Larven konnten SFG-Rickettsien gefunden werden. Mit 1,8 % war die Prävalenz in Kleinsäugerzecken fast gleich hoch wie in Vogelzecken aus Reifenstein. Drei Prozent der Kleinsäuger trugen *Rickettsia*-positive Larven. Im Gegensatz zu den Vogelzecken wurde hier jedoch, bis auf eine nicht näher charakterisierte Probe, ausschließlich *R. helvetica* nachgewiesen (Tab. 19, S. 53).

In einer aktuellen Untersuchung von Kleinsäugerzecken in Polen wurden ebenfalls alle positiven Amplikons als *R. helvetica* identifiziert (STANCZAK et al. 2009). Die Prävalenz in Larven war in dieser Arbeit ähnlich gering (2,1 %). Während in der vorliegenden Arbeit allerdings ausnahmslos Larven mit Rickettsien infiziert waren, fanden STANCZAK et al. (2009) auch in 8 % der Nymphen *Rickettsia*-spezifische DNA. Die Hauptursache für die

fehlenden Infektionen bei Nymphen bei den eigenen Untersuchungen liegt aber höchstwahrscheinlich in der ohnehin geringen Anzahl an Kleinsäugern parasitierender Nymphen (N = 13).

Alle Bioplate waren negativ, sodass, unter Berücksichtigung einer möglichen transovariellen Transmission von Rickettsien, die Reservoirkompetenz von Kleinsäugern für Erreger der SFG nicht abschließend geklärt werden kann. Es bleibt also festzustellen, dass nur xenodiagnostische Tests mit rickettsiämischen Kleinsäugern und sterilen Larven gesicherte Aussagen zulassen werden.

#### 5.2.3.3 Wirtssuchende Zecken und Vergleich mit gesogenen Larven

Die Prävalenz von SFG-Rickettsien bei Freilandzecken (6,7 %) war zwar höher als bei Zecken von Kleinsäugern und Vögeln, jedoch ist diese Relation nicht statistisch signifikant. Deutliche Unterschiede wurden aber beim Vergleich der einzelnen Untersuchungsgebiete festgestellt, wobei die Gebiete Karlshagen (9,9 %) und Reifenstein (7,7 %) die höchsten Prävalenzen aufwiesen.

Verschiedene Studien zeigen, dass SFG-Rickettsien, wie auch andere zeckenassoziierte Erreger, in Europa und auch innerhalb Deutschlands heterogen verteilt sind (Tab. 3, S. 17). So wurden beispielsweise in Ostthüringen (14,7 %) und Brandenburg (14,2 %) höhere Prävalenzen in Freilandzecken festgestellt (HILDEBRANDT et al. 2009b; PICHON et al. 2006) als in der vorliegenden Arbeit. In Bayern waren dagegen nur 0,5 %-3,6 % der Zecken infiziert, und in Baden-Württemberg wurden Prävalenzen von 5,6 % bis zu 13,3 % ermittelt (DOBLER und WÖLFEL 2009; HARTELT et al. 2004; SILAGHI et al. 2008b).

Ein Großteil der positiven Proben wurde zwar nicht näher bestimmt, jedoch konnten mit *R. monacensis* und *R. helvetica* beide in Vogelzecken gefundene Spezies auch in wirtssuchenden Zecken identifiziert werden. Neben *R. massilae* sind diese Arten bereits in früheren Studien in Deutschland nachgewiesen worden, allerdings war *R. helvetica* (3,5 %-14,2 %) mit Abstand am häufigsten, während die beiden anderen Spezies nur sehr selten (0,5 %-1,7 %) gefunden wurden (DOBLER und WÖLFEL 2009; DOBLER et al. 2009; HARTELT et al. 2004; PICHON et al. 2006; SILAGHI et al. 2008b; WÖLFEL et al. 2006).

Im Vergleich zu gesogenen Larven zeigten wirtssuchende Nymphen aus dem Gebiet Reifenstein die höchste Infektionsrate mit Rickettsien (Abb. 19, S. 66), was vermuten lässt, dass *I. ricinus* das Hauptreservoir für diese Erreger ist. Es bleibt aber weiterhin unklar, ob *I. ricinus* in Deutschland auch als Überwinterungsreservoir für SFG-Rickettsien, insbesondere für die mediterrane Spezies *R. monacensis* fungiert, die Rickettsien also dauerhaft in unseren Breiten vorkommen oder jährlich von neuem mit Zugvögeln aus südlicheren Regionen eingebracht werden.



Auch wäre es möglich, dass weitere, nicht in dieser Arbeit untersuchte Wirbeltiere eine Rolle als Reservoir für *Rickettsia* spp. spielen. Hier werden beispielsweise Wildschweine, Rot- und Rehwild diskutiert (MARQUEZ 2009; SPRONG et al. 2009). Daneben wurden auch an Luchsen, Dachsen, Füchsen, Hunden, Katzen und Pferden *Rickettsia*-positive Zecken gefunden (BORETTI et al. 2009; MARQUEZ und MILLAN 2009).

#### 5.2.4 *Babesia* spp.

##### 5.2.4.1 Vögel

Intraerythrozytische Parasiten der Gattung *Babesia* wurden in 8,5 % der Vogelzecken gefunden. Somit waren Babesien nach den Borrelien die zweithäufigsten Erreger bei an Vögeln parasitierenden *I. ricinus*-Zecken. *Babesia* Spezies wurden in beiden subadulten Zeckenstadien nachgewiesen, am häufigsten in Larven (Kap. 4.2.4, S. 47).

Aus der Literatur ist bekannt, dass Vögel mit einem breiten Spektrum aviärer Babesien infiziert sind (PEIRCE 2000, 2005), jedoch weiß man bislang nichts über das Vorkommen von Arten des *Ba. divergens*- oder *Ba. microti*-Komplexes bei Vögeln. In einer Studie in Polen wurden Zecken von verschiedenen Vogelarten auf *Babesia* spp. untersucht, wobei in keiner Probe *Babesia*-spezifische DNA festgestellt wurde und die Autoren daher schlussfolgerten, dass Vögel keine kompetenten Reservoirs für diese Erregergruppe seien (SKOTARCZAK et al. 2006). Zwar wurde in dieser Untersuchung das gleiche Zielgen wie in der vorliegenden Arbeit genutzt (18S rRNA), jedoch wurden hier andere Primer eingesetzt, die bislang in keiner anderen Studie Verwendung fanden und ein viel größeres Fragment produzieren (1650 bp). Es ist also fraglich, ob bei SKOTARCZAK et al. (2006), evtl. aufgrund ungeeigneter Primer, eine mangelnde Sensitivität der Methode vorlag.

In der vorliegenden Arbeit wurden somit zum ersten Mal Infektionen mit human-pathogenen Babesien bei Vogelzecken beschrieben. Auffällig war, dass neben der transovariell übertragenen Paarhufer-assoziierten Spezies *Ba. divergens* auch kleine Babesien des *Ba. microti*-Komplexes in Larven von Vögeln nachgewiesen wurden, bei denen diese Art der Transmission nicht stattfindet (GRAY und WEISS 2008; HOMER et al. 2000).

An keinem Vögel mit einer *Ba. microti*-positiven Larve parasitierten weitere Zecken, die mit dieser Spezies infiziert waren, womit Cofeeding als Infektionsursache unwahrscheinlich ist. Es kann also angenommen werden, dass Vögel zumindest für *Ba. microti* eine Reservoirkompetenz aufweisen.

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Erregern waren neben Amseln keine weiteren Drosselarten mit *Babesia*-infizierten Zecken befallen, jedoch wurden positive Zecken bei Gimpel, Heckenbraunelle, Kohlmeise, Rotkehlchen und Sumpfrohrsänger gefunden. Trotzdem scheinen Amseln die wichtigsten potentiellen Reservoirs zu sein, denn an mehr als einem Drittel dieser Tiere wurden Zecken mit Babesieninfektionen gefunden (Tab. 17, S. 48).

Es fiel weiterhin auf, dass in Reifenstein (11,8 %), einem Gebiet, in dem ein breites Spektrum an Säugetierwirten vorkommt, deutlich mehr *Babesia*-positive Vogelzecken nachgewiesen wurden als auf der Greifswalder Oie (4,7 %), wo Siebenschläfer und Schafe die einzigen ansässigen Säugetierarten sind. Auch dominierten hier, im Kontrast zur Greifswalder Oie, Paarhufer-assoziierte *Ba. divergens*-like Spezies. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der geringen Abundanz von wirtssuchenden Zecken und Säugetierreservoirs auf der Greifswalder Oie, sodass davon auszugehen ist, dass in diesem Untersuchungsgebiet die überwiegende Mehrheit der infizierten Vogelzecken von den Vögeln aus anderen Regionen Deutschlands oder Europas mitgebracht wurde (Kap. 5.1.1, S. 68). Neben einer potentiellen Reservoirfunktion ist daher ebenso eine wichtige Rolle von Vögeln für die Verbreitung humanpathogener Babesien naheliegend.

#### 5.2.4.2 Kleinsäuger

Bei Zecken von Kleinsäugetieren wurden humanpathogene Babesien (6,6 %) deutlich häufiger nachgewiesen als andere Erreger (1,1 %-2,6 %). Aufgrund von Nachweisen in verschiedenen Kleinsäugetierspezies wird angenommen, dass Kleinsäuger ein Reservoir, v.a. für *Ba. microti*, darstellen (HUNFELD et al. 2008; SIŃSKI et al. 2006b). Jedoch gibt es bislang keine Studien, in denen tatsächlich das Vorkommen von Babesien in an Kleinsäugetieren parasitierenden Zecken untersucht wurde, weshalb zwar eine Wirts-, nicht jedoch eine Reservoirfunktion dieser Tiere als gesichert betrachtet werden kann.

In der vorliegenden Arbeit ist erstmals der Nachweis von großen und kleinen *Babesia* spp. in *I. ricinus*-Zecken von Kleinsäugetieren gelungen. Ein Großteil der Infektionen mit Vertretern beider Spezieskomplexe trat in parasitierenden Larven auf. An keinem Tier saß mehr als eine *Ba. microti*-positive Zecke, sodass Cofeeding unwahrscheinlich ist. Die Reservoirkompetenz von Kleinsäugetieren gilt also nach den vorgelegten Ergebnissen zumindest für *Ba. microti* als gesichert. Für große Babesien sind weitere xenodiagnostische Tests nötig, um eine potentielle Reservoirfunktion zu bestätigen, da eine transovarielle Infektion der Larven nicht ausgeschlossen werden kann.

An beiden untersuchten Kleinsäugerarten wurden *Ba. microti*-infizierte Larven gefunden. Die Annahme, dass v.a. Wühlmäuse, nicht jedoch *Apodemus flavicollis* Reservoirs für diese Spezies sind (SINISKI et al. 2006b), kann also nicht bestätigt werden.

Die Untersuchung der Saisonalität ergab bei Kleinsäugerzecken einen deutlichen Anstieg der *Babesia*-Prävalenzen vom Frühjahr (3,4 %) zum Sommer (10,1 %). Die Gründe hierfür können, ähnlich wie bei Borrelien (TÄLLEKLINT und JAENSON 1995), in einer höheren Mortalität infizierter Nager in den Wintermonaten liegen. Hinzu kommt eine geringere Zeckenaktivität und somit niedrige Infektionswahrscheinlichkeit in den Wintermonaten.

Zwar brachte die molekularbiologische Untersuchung der Ohrbiopate für alle Proben ein negatives Ergebnis, jedoch ist unklar, ob Ohrgewebe ein geeignetes Material für einen Erregernachweis ist (vgl. Kap. 5.2.1.2, S. 78). Zur genauen Bestimmung des Infektionsstatus von Kleinsäufern wäre also die Untersuchung verschiedener Gewebeproben notwendig. Da für eine Tötung der Tiere für die vorliegende Arbeit keine behördliche Genehmigung vorlag, waren derartige Tests allerdings nicht möglich.

#### 5.2.4.3 Wirtssuchende Zecken und Vergleich mit gesogenen Larven

In Freilandzecken war die Prävalenz von Babesien mit 9,6 % im Vergleich zu anderen Erregern (0,6 %-6,7 %) am höchsten. Fast alle Infektionen wurden in wirtssuchenden Nymphen festgestellt (Kap. 4.4.3, S. 59). Obwohl die Anzahl freilandgefangener Adulte generell klein war, waren die Unterschiede zu den Nymphen signifikant, was vermuten lässt, dass Babesien im Zeckenzyklus nicht immer effektiv transstadiell übertragen werden.

Deutliche Unterschiede traten auch beim Vergleich der *Babesia*-Prävalenzen zwischen den einzelnen Untersuchungsgebieten zutage. So variierten die Infektionsraten zwischen 0 % im Hütter Wohld bis zu 17,3 % in Karlshagen, womit dieses Gebiet die höchste bislang in Deutschland gemessene Babesienprävalenz aufweist.

Zwar wurde in der Mehrheit der Proben *Babesia microti* identifiziert (68,1 %), doch waren auch die Anteile der beiden Spezieskomplexe an der Gesamtprävalenz je nach Gebiet unterschiedlich. So war das Verhältnis zwischen großen und kleinen Babesien in Reifenstein nahezu ausgeglichen, während in Karlshagen und Bansin in der überwiegenden Mehrheit der positiven Zecken *Ba. microti* nachgewiesen wurde (Kap. 4.4.3, S. 59). Die Ursache für diese Unterschiede könnte, die bislang angenommenen Reservoirassoziationen vorausgesetzt, in der unterschiedlichen Abundanz von Paarhufern und Kleinsäufern oder weiteren Wirbeltierreservoirs liegen.

Auch in der Literatur ist eine große Variabilität der Prävalenzen verschiedener *Babesia* ssp. innerhalb Europas ersichtlich (Tab. 4, S. 21). Während beispielsweise in Norwegen eine *Ba. divergens*-Prävalenz von 0,9 % ermittelt wurde (RADZIJEVSKAJA et al. 2008), ist diese Spezies in Österreich in 51,7 % der Freilandzecken Babesien nachgewiesen worden (BLASCHITZ et al. 2008). Die Prävalenz von *Ba. microti* variiert, je nach Untersuchungsgebiet, innerhalb Europas zwischen 0,1 %-2,8 % in Deutschland (HARTELT et al. 2004; HILDEBRANDT et al. 2009a) und 0,7 %-13,3 % in Polen (KUZNAGRYGIEL et al. 2002; SKOTARCZAK und CICHOCKA 2001; SKOTARCZAK et al. 2003; SKOTARCZAK und SAWCZUK 2003; STANCZAK et al. 2004; WOJCIK-FATLA et al. 2006).

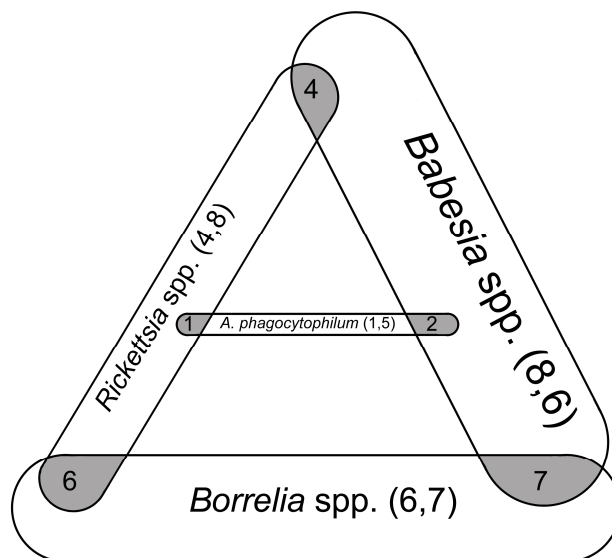
Auch temporäre Variationen der Babesienprävalenz in Freilandzecken innerhalb eines Untersuchungsgebietes wurden beschrieben (HILDEBRANDT et al. 2009a). Die Ursachen dafür sind ähnlich komplex wie bei den anderen untersuchten Erregern und wären nur durch aufwendige Studien erforschbar, welche die Erfassung einer Vielzahl ökologischer, geographischer und meteorologischer Parameter einschließen.

Beim Vergleich der Prävalenzen von großen und kleinen Babesien in gesogenen Larven und wirtssuchenden Nymphen im Gebiet Reifenstein fällt auf, dass Vögel die meisten *Babesia*-infizierten Larven trugen (Abb. 19, S. 66). Generell scheinen Vögel also für Babesien, zumindest für *Ba. microti*, kompetentere Reservoirs zu sein als Kleinsäuger. Während jedoch in Larven von Kleinsäufern und Nymphen aus dem Freiland *Ba. microti* etwas häufiger oder zumindest gleich oft nachgewiesen wurden wie *Ba. divergens*, überwog bei an Vögeln parasitierenden Larven der Anteil von *Ba. divergens*, was nahelegt, dass Vögel auch eine Rolle für die Aufrechterhaltung des Infektionszyklus dieser Spezies einnehmen.

### 5.2.5 Koinfektionen

Es ist bekannt, dass Koinfektionen bei Mensch und Tier zu schwereren Krankheitsverläufen und Problemen bei Diagnose und Behandlung führen (BENACH et al. 1985; KRAUSE et al. 1992; KRAUSE et al. 1996; KRAUSE et al. 2002; NADELMAN et al. 1997; OLESON et al. 2003; SWANSON et al. 2006; THOMAS et al. 2001). Besonders oft wurden Mischinfektionen bei Patienten mit Lyme-Borreliose beschrieben, wobei sogar Infektionen mit drei verschiedenen Erregern auftreten können (SWANSON et al. 2006). Eine Studie aus den USA zeigte beispielsweise, dass 39 % der untersuchten Patienten mit zeckenassoziierten Erkrankungen Koinfektionen aufwiesen, hauptsächlich mit Borrelien und Babesien (KRAUSE et al. 2002). Aufgrund häufig auftretender Behandlungs- und Diagnoseprobleme sowie ihrer Vielgestaltigkeit wurde sogar die Frage aufgeworfen, ob die LB nicht generell eine polymikrobielle Erkrankung ist (OWEN 2006).

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass Koinfektionen mit verschiedenen zeckenassoziierten Krankheitserregern nicht selten in *I. ricinus*-Zecken zu finden sind (Kap. 4.5, S. 60). Dabei tritt eine Vielzahl unterschiedlicher Kombinationen auf (Abb. 21).



**Abb. 21 Schematische Darstellung der Koinfektionen in *I. ricinus*-Zecken unterschiedlichen Ursprungs**

Die unterschiedliche Größe der Überlappungsbereiche (grau) soll den prozentualen Anteil der Koinfektionen an der jeweiligen Gesamtprävalenz verdeutlichen. Die Anzahl aufgetretener Koinfektionen steht in den Überlappungsbereichen. Die Gesamtprävalenzen der einzelnen Pathogengruppen in allen untersuchten Zecken (in Klammern) werden durch die unterschiedlichen Größen der Felder symbolisiert. Koinfektionen von Zecken mit mehreren *Borrelia* Spezies sind nicht dargestellt.

Da zeckenassoziierte Erreger zwar die gleichen Infektionswege aber verschiedene ökologische Nischen in Form von unterschiedlichen Organen und Geweben nutzen, können nahezu alle Kombinationen im Wirbeltierwirt auftreten (KORENBERG 2004). Es wurde zwar angenommen, dass einige Erreger (z.B. *A. phagocytophilum*) nicht gemeinsam mit anderen intrazellulären Pathogenen vorkommen können (ALEKSEEV et al. 2004), die vorgelegten Ergebnisse und andere Studien widerlegen dies jedoch (HARTELT et al. 2004; HILDEBRANDT et al. 2009b; SKOTARCZAK et al. 2003; WOJCIK-FATLA et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit fanden sich besonders häufig bei *A. phagocytophilum*- und *Rickettsia* spp.-infizierten Zecken Koinfektionen mit anderen Erregern (17,6 % bzw. 17,9 %). Die Beobachtung, dass zwischen *A. phagocytophilum* und *Borrelia* spp. keine Koinfektionen auftraten ist vermutlich auf die ohnehin geringe Prävalenz von Anaplasmen zurückzuführen, denn in der Literatur wurde diese Kombination häufig beschrieben (FINGERLE et al. 1999; HILDEBRANDT et al. 2003; SKOTARCZAK et al. 2003; SWANSON et al. 2006; WOJCIK-FATLA et al. 2009).

Insgesamt waren 12 % der *Borrelia*-positiven Zecken gleichzeitig mit mindestens zwei verschiedenen Erregern infiziert. Diese Zahl zeigt, dass das Risiko für den Menschen, sich zugleich mit mehreren zeckenassoziierten Erregern zu infizieren und unter

Umständen schwere Krankheitsverläufe zu entwickeln, auch in den Untersuchungsgebieten bestand.

Koinfektionen mit mehreren *Borrelia* spp., die auch in der vorliegenden Arbeit auftraten (5,4 % der *Borrelia*-Positiven), können ebenfalls zu schweren Krankheitsverläufen der LB führen (HOVIUS et al. 2007). Dabei dominierten Kombinationen von zwei *B. garinii*-OspA-Typen oder *B. garinii* mit *B. valaisiana* (Tab. 23, S. 61). Da Koinfektionen mit Spezies der selben Gattung nur mittels RFLP, nicht aber durch Sequenzanalyse nachgewiesen werden können, liegt die Anzahl bei den Borrelien vermutlich noch höher.

Eine Larve von einer Amsel war mit drei verschiedenen *Borrelia* Spezies infiziert (*B. valaisiana* Subtyp I, *B. garinii*-OspA-Typen 6 und 8), was darauf schließen lässt, dass dieses Tier mit allen drei Genospezies infiziert war und diese zusammen auf die Larve übertragen hat. Auch hier zeigt sich also die hohe Reservoirkompetenz von Vögeln für LB Erreger.

Studien über Koinfektionen bei Vögeln oder Vogelzecken sind rar. Bei einer Untersuchung aus Russland wurden in fünf von acht *Anaplasma*-infizierten Vogelzecken Borrelien nachgewiesen, eine davon war mit zwei verschiedenen *Borrelia* spp. infiziert (ALEKSEEV et al. 2001). Weitere Koinfektionen in Zecken von Vögeln wurden bislang nicht beschrieben, sodass die vorliegenden Ergebnisse als erster Nachweis von unterschiedlichen Varianten multipler Infektionen in einem hohen Prozentsatz von Vogelzecken angesehen werden können (Tab. 23, S. 61).

Betrachtet man die Anzahl der verschiedenen Pathogene in Zecken, die an einem Individuum saßen, so fällt auf, dass bei mehr als einem Drittel der Amseln gleich mehrere Pathogene in parasitierenden Zecken nachgewiesen wurden. Eine Amsel trug Zecken, die mit insgesamt sechs verschiedenen Erregern infiziert waren (Tab. 24, S. 62). Zwar bedeutet dies nicht immer, dass die Vögel auch mit allen Erregern infiziert waren, es bestätigt jedoch, dass Vögel, v.a. Drosseln, eine wichtige Rolle in der Verbreitung von einer Vielzahl zeckenassoziiierter Erreger einnehmen.

Auch bei den Kleinsäufern wurden an einzelnen Individuen Zecken mit verschiedenen Infektionen gefunden, jedoch war der Anteil hier deutlich geringer als bei den Vögeln (2,4 %). Dies weist wiederum darauf hin, dass Kleinsäuger ein kleineres Spektrum von zeckenassoziierten Pathogenen übertragen als Vögel. Bei einer Studie in Irland, bei der man neben Borrelien- auch Wirts-DNA in freilandgefangenen Nymphen untersuchte, wurde in 18 Nymphen mit multiplen Borrelieninfektionen Singvogel-DNA nachgewiesen und nur in einer Kleinsäuger-DNA, was diese These, zumindest für Borrelien bestätigt (PICHON et al. 2005). Eine Arbeit aus der Slowakei, bei der Kleinsäuger und parasitierende Larven auf verschiedene Pathogene getestet wurden, kam zu dem

Ergebnis, dass weder bei Gewebeproben, noch bei gesogenen Larven Koinfektionen gefunden wurden, was diese Annahme ebenfalls unterstützt (SPITALSKA et al. 2008). Bei einer weiteren Untersuchung aus der Slowakei wurde in 1,8 % der Ohrbioptate von Kleinsäugern eine Koinfektion von *A. phagocytophilum* und einer *Borrelia* Spezies (ŠTEFANČÍKOVÁ et al. 2008), während diese Kombination in der vorliegenden Arbeit bei an Kleinsäugern gesogenen Zecken oder Gewebeproben nicht auftrat.

Insgesamt zeigen die vorgelegten Daten, dass, angesichts der Häufigkeit (10 % aller positiven Zecken) und Vielgestaltigkeit (Tab. 23, S. 61) der Koinfektionen in *I. ricinus*-Zecken, das Risiko von multiplen Infektionen für Mensch und Tier in den Untersuchungsgebieten relativ hoch ist. Die Tatsache, dass solche Koinfektionen bei vielen Patienten unerkannt bleiben, macht die Notwendigkeit einer Überarbeitung der Diagnose- und Therapiestandards für zeckenassoziierte Erkrankungen umso deutlicher (KRAUSE et al. 2002).

## 6 Zusammenfassung

Zeckenassoziierte Krankheitserreger wie Spirochäten der Lyme-Borreliose-Gruppe, *Anaplasma phagocytophilum*, Rickettsien der Zeckenbissfieber-Gruppe (SFG) und intraerythrozytische Parasiten der Gattung *Babesia* verursachen eine Vielzahl teils lebensbedrohlicher Erkrankungen bei Mensch und Tier. Obwohl sie, unter anderem im Zuge der globalen Erwärmung, auch in Europa immer mehr an Bedeutung gewinnen, ist das Wissen über ihre Ökologie, insbesondere ihre spezifischen Reservoirwirte, noch immer lückenhaft.

Zur Erweiterung des Kenntnisstandes über ihre natürlichen Transmissionszyklen wurden *Ixodes ricinus*-Zecken von Vögeln und Kleinsäugetieren entnommen sowie im Freiland gesammelt und auf Pathogen-spezifische DNA untersucht. Zudem wurden erstmals Erregerprävalenzen von an verschiedenen Wirtsspezies gesogenen und wirtssuchenden Zecken innerhalb eines Untersuchungsgebietes verglichen.

Trotz ähnlicher Lebensweise waren verschiedene Vogelarten unterschiedlich stark mit Zecken infestiert, was auf eine immunologisch bedingte, artspezifische Wirtskompetenz hinweist. Vogelzecken (14,7 %) zeigten im Gegensatz zu Zecken von Kleinsäugetieren (2,6 %) deutlich höhere Prävalenzen und ein breiteres Spektrum von *Borrelia*-Genospezies, weshalb die Bedeutung von Kleinsäugetieren als Reservoirwirte für diese Erreger geringer ist als bisher angenommen. Vor allem Amseln und andere Drosselarten scheinen kompetente Reservoirs für eine Vielzahl von *Borrelia* spp. zu sein. Überraschend war der Nachweis von *B. afzelii* (22 % der Positiven) und der Erstnachweis von *B. bavariensis* (3,4 % d. Pos.) in subadulten Vogelzecken, während diese, bislang als kleinsäugerassoziiert geltenden Spezies, nur selten bzw. gar nicht in Zecken von Kleinsäugetieren gefunden wurden. Die bisher angenommenen strikten Assoziationen bestimmter *Borrelia* Spezies mit verschiedenen Wirbeltiergruppen müssen daher neu diskutiert werden.

Die Prävalenz von *A. phagocytophilum* war zwar in Vogelzecken (2,7 %) etwas höher als in Zecken von Kleinsäugetieren (1,1 %), jedoch kann aufgrund der Verteilung der Infektionen auf die beiden subadulten Zeckenstadien nicht davon ausgegangen werden, dass Vögel ein Reservoir für diese Erreger sind. Die vorgelegten Ergebnisse deuten aber darauf hin, dass Kleinsäugetiere in geringem Maße reservoirkompetent für *A. phagocytophilum* sind.

Erstmals wurden in Deutschland auch SFG-Rickettsien in Vogel- und Kleinsäugerzecken nachgewiesen (4,5 % bzw. 1,8 %). Dabei wurden *R. monacensis* und *R. helvetica* identifiziert. Da Rickettsien transovariell in *I. ricinus* übertragen werden und alle



Kleinsäugerbiopate negativ waren, können anhand der vorliegenden Daten keine Rückschlüsse auf die Reservoirkompetenz der untersuchten Wirbeltiere für diese Erreger gezogen werden. Dennoch kann zumindest Zugvögeln eine wichtige Rolle bei der Verbreitung verschiedener *Rickettsia* spp. über weite Distanzen zugeschrieben werden.

Des Weiteren gelang in der vorliegenden Arbeit der Erstnachweis großer und kleiner humanpathogener *Babesia* spp. in *I. ricinus*-Zecken von Vögeln (8,5 %) und Kleinsäufern (6,6 %). Da nicht transovariell übertragbare, kleine Babesien in Larven beider Wirbeltiergruppen gefunden wurden, kann davon ausgegangen werden, dass Vögel und Kleinsäuger zumindest für diese *Babesia* spp. eine Reservoirfunktion haben.

Auch die Prävalenzen der Freilandzecken bestätigen, dass *I. ricinus* in Deutschland als Vektor für alle vier untersuchten Pathogengruppen in Erscheinung tritt. Der hohe Anteil von Zecken, in denen mindestens zwei verschiedene Erreger nachgewiesen wurden (10 %), weist darauf hin, dass das Risiko von multiplen Infektionen für Mensch und Tier in den Untersuchungsgebieten relativ hoch ist. Da diese oft mit schweren Krankheitsverläufen sowie Behandlungs- und Diagnoseproblemen verbunden sind, müssen die Therapie- und Diagnosestandards für zeckenassoziierte Erkrankungen überarbeitet werden.

## Summary

Tick-borne pathogens like spirochaetes of the Lyme borreliosis (LB) group, *Anaplasma phagocytophilum*, rickettsiae of the spotted fever group (SFG) and intraerythrocytic parasites of the genus *Babesia*, cause a great variety of sometimes life-threatening diseases in animals and humans. Although, also in the course of climate change, their importance as emerging human diseases in Europe is increasing, many issues about their ecology, e.g. reservoir host specificity, are still unclear.

To gain more information about their natural transmission cycles, bird- and rodent-feeding as well as host-seeking *Ixodes ricinus* ticks have been collected and tested for pathogen-specific DNA. For the first time, prevalences of various agents in free-living *I. ricinus*-stages and ticks feeding on different vertebrate species were compared within a single natural habitat.

Although their lifestyle is similar, the examined bird species were unequally infested with ticks, indicating species-specific differences in their immune response to tick antigens. In contrast to ticks from small mammals (2,6 %), bird-feeding ticks (14,7 %) were more frequently infected with a broader range of *Borrelia* spp., suggesting that rodents are less important as reservoir hosts for LB-spirochaetes than previously thought. In particular blackbirds and other thrushes seem to be competent reservoirs for a variety of *Borrelia* species. Surprisingly, *B. afzelii* and *B. bavariensis*, two species considered to be rodent-associated, were found in 22 % and 3,4 % of positive bird-feeding subadult ticks whereas they were rare or absent in ticks from small mammals. This suggests that the so far assumed strict associations of particular *Borrelia* spp. with different vertebrate species have to be rediscussed.

The prevalence of *A. phagocytophilum* was slightly higher in bird-feeding (2,7 %) than in rodent-feeding ticks (1,1 %), but, because of the distribution of infections in both subadult *I. ricinus* stages, a reservoir role of birds for this agent cannot be confirmed. However, the data indicate that small mammals may have a limited reservoir function for the agents of human granulocytic anaplasmosis.

For the first time, SFG-rickettsiae were detected in bird- (4,5 %) and rodent-feeding ticks (1,8 %) in Germany. Among this group, *R. monacensis* and *R. helvetica* were identified. Because rickettsiae are transmitted transovarially by *I. ricinus* and all tissue samples from rodents were negative, no conclusions about the reservoir role of the examined host species for those pathogens can be drawn from the data. Nevertheless, at least a vector

function of migrating birds in the dispersal of *Rickettsia* spp. over long distances can be assumed.

Furthermore, this study provides the first record of human pathogenic large and small *Babesia* spp. in *I. ricinus* ticks collected from birds (8,5 %) and rodents (6,6 %). The fact that not transovarially transmitted small *Babesia* spp. were found in larvae feeding on both vertebrate groups, suggests that birds and small mammals are able to transmit at least *Ba. microti*-like spp. to feeding ticks.

The prevalences in questing ticks also confirm that *I. ricinus* acts as vector of all four pathogens in Germany. The large amount of ticks that were coinfecting with at least two different agents (10 %) suggests that in the areas of investigation, the risk for humans and animals of acquiring multiple infections is relatively high. Against the background that coinfections often lead to severe clinical outcomes as well as problems in diagnosis and treatment, the diagnosis and therapy guidelines for tick-borne diseases have to be updated.



**Literaturverzeichnis**

- Alekseev AN, Dubinina HV, Semenov AV, Bolshakov CV** (2001): Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. *J Med Entomol*; 38:471-474
- Alekseev AN, Dubinina HV, Jushkova OV** (2004): First report on the coexistence and compatibility of seven tick-borne pathogens in unfed adult *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina: Ixodidae). *Int J Med Microbiol*; 293 Suppl 37:104-108
- Anthonissen FM, De Kesel M, Hoet PP, Bigaignon GH** (1994): Evidence for the involvement of different genospecies of *Borrelia* in the clinical outcome of Lyme disease in Belgium. *Res Microbiol*; 145:327-331
- Bakken JS, Dumler JS** (2000): Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis*; 31:554-560
- Balmelli T, Piffaretti JC** (1995): Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Res Microbiol*; 146:329-340
- Barandika JF, Hurtado A, Garcia-Sanmartin J, Juste RA, Anda P, Garcia-Perez AL** (2008): Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*; 8:829-835
- Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PA** (1992): Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol*; 42:378-383
- Bassetti S** (2004): Rickettsiosen der Zeckenbissfieber-Gruppe. *Internist*; 45:669-676
- Belongia EA** (2002): Epidemiology and impact of coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis*; 2:265-273
- Benach JL, Coleman JL, Habicht GS, MacDonald A, Grunwaldt E, Giron JA** (1985): Serological evidence for simultaneous occurrences of Lyme disease and babesiosis. *J Infect Dis*; 152:473-477
- Bennet L, Halling A, Berglund J** (2006): Increased incidence of Lyme borreliosis in southern Sweden following mild winters and during warm, humid summers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 25:426-432
- Bergström S, Noppa L, Gylfe Å, Östberg Y**: Molecular and Cellular Biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: Gray J, Kahl O, Lane RS, Stanek G (Hrsg) Lyme Borreliosis Biology, Epidemiology and Control, *CABI Publishing*, New York, 2002:47-90
- Bertolotti L, Tomassone L, Tramuta C, Grego E, Amore G, Ambrogi C, Nebbia P, Mannelli A** (2006): *Borrelia lusitaniae* and spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Tuscany, central Italy. *J Med Entomol*; 43:159-165
- Beugnet F, Marie JL** (2009): Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet Parasitol*; 163:298-305
- Bjoersdorff A, Bergstrom S, Massung RF, Haemig PD, Olsen B** (2001): *Ehrlichia*-infected ticks on migrating birds. *Emerg Infect Dis*; 7:877-879
- Blaschitz M, Narodoslavsky-Gfoller M, Kanzler M, Stanek G, Walochnik J** (2008): *Babesia* species occurring in Austrian *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol*; 74:4841-4846
- Bonnet S, Jouglin M, L'Hostis M, Chauvin A** (2007): *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis*; 13:1208-1210

- Boretti FS, Perreten A, Meli ML, Cattori V, Willi B, Wengi N, Hornok S, Honegger H, Hegglin D, Woelfel R, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R** (2009): Molecular Investigations of *Rickettsia helvetica* infection in dogs, foxes, humans, and *Ixodes ticks*. *Appl Environ Microbiol*; 75:3230-3237
- Bown KJ, Begon M, Bennett M, Woldehiwet Z, Ogden NH** (2003): Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*; 9:63-70
- Buchwald A** (1883): Ein Fall diffuser idiopathischer Haut Atrophie. *Archives of Dermatology and Syphilis*; 10:553-556
- Burgdorfer W, Friedhoff KT, Lancaster JL, Jr.** (1966): Natural history of tick-borne spotted fever in the USA. Susceptibility of small mammals to virulent *Rickettsia rickettsii*. *Bull World Health Organ*; 35:149-153
- Burgdorfer W, Aeschlimann A, Peter O, Hayes SF, Philip RN** (1979): *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Trop*; 36:357-367
- Burgdorfer W, Cooney JC, Mavros AJ, Jellison WL, Maser C** (1980): The role of cottontail rabbits (*Sylvilagus* spp.) in the ecology of *Rickettsia rickettsii* in the United States. *Am J Trop Med Hyg*; 29:686-690
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP** (1982): Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science*; 216:1317-1319
- Burri C, Cadenas FM, Douet V, Moret J, Gern L** (2007): *Ixodes ricinus* density and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a North-facing altitudinal gradient in the Rhone Valley (Switzerland). *Vector Borne Zoonotic Dis*; 7:50-58
- Canica MM, Nato F, du Merle L, Mazie JC, Baranton G, Postic D** (1993): Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis*; 25:441-448
- Casati S, Sager H, Gern L, Piffaretti JC** (2006): Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann Agric Environ Med*; 13:65-70
- Casjens S, Palmer N, van Vugt R, Huang WM, Stevenson B, Rosa P, Lathigra R, Sutton G, Peterson J, Dodson RJ, Haft D, Hickey E, Gwinn M, White O, Fraser CM** (2000): A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol*; 35:490-516
- Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH** (1994): Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol*; 32:589-595
- Christova I, Gladnishka T** (2005): Prevalence of infection with *Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in rodents from an endemic focus of tularemia in Bulgaria. *Ann Agric Environ Med*; 12:149-152
- Cisak E, Chmielewska-Badora J, Rajtar B, Zwolinski J, Jablonski L, Dutkiewicz J** (2002): Study on the occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks collected in Lublin region (eastern Poland). *Ann Agric Environ Med*; 9:105-110
- Clifford CM, Sonenshine DE, Atwood EL, Robbins CS, Hughes LE** (1969): Tests on ticks from wild birds collected in the eastern United States for rickettsiae and viruses. *Am J Trop Med Hyg*; 18:1057-1061
- Comstedt P, Bergstrom S, Olsen B, Garpmo U, Marjavaara L, Mejlom H, Barbour AG, Bunikis J** (2006): Migratory passerine birds as reservoirs of Lyme borreliosis in Europe. *Emerg Infect Dis*; 12:1087-1095
- Danielova V, Rudenko N, Daniel M, Holubova J, Materna J, Golovchenko M, Schwarzova L** (2006): Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic. *Int J Med Microbiol*; 296 Suppl 40:48-53

- Dautel H, Dippel C, Oehme R, Hartelt K, Schettler E** (2006): Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4. *Int J Med Microbiol*; 296, Suppl 1:149-156
- Dautel H, Dippel C, Kämmer D, Werkhausen A, Kahl O** (2008): Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *Int J Med Microbiol*; 298 (Suppl. 1):50-54
- de la Fuente J, Ruiz-Fons F, Naranjo V, Torina A, Rodriguez O, Gortazar C** (2008): Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Res Vet Sci*; 84:382-386
- de Mishelis S, Sewell HS, Collares-Pereira M, Santos-Reis ML, Schouls M, Benes V, Holmes EC, Kurtenbach K** (2000): Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. *J Clin Microbiol*; 38:2128–2133
- de Silva AM, Fikrig E** (1995): Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. *Am J Trop Med Hyg*; 53:397-404
- Demaerschallck I, Ben Messaoud A, De Kesel M, Hoyois B, Lobet Y, Hoet P, Bigaignon G, Bollen A, Godfroid E** (1995): Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J Clin Microbiol*; 33:602-608
- Derdáková M, Halanová M, Stanko M, Štefančíková A, Čisláková L, Pet'ko B** (2003): Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from eastern Slovakia. *Ann Agric Environ Med*; 10:269-271
- Dizij A, Kurtenbach K** (1995): *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. *Parasite Immunol*; 17:177-183
- Dobler G, Wölfel R** (2009): Fleckfieber und andere Rickettsiosen: Alte und neu auftretende Infektionen in Deutschland. *Dtsch Arztebl Int*; 106:348-354
- Dobler G, Essbauer S, Wölfel R** (2009): Isolation and preliminary characterisation of '*Rickettsia monacensis*' in south-eastern Germany. *Clin Microbiol Infect*; [vorläufige elektronische Veröffentlichung, noch nicht im Druck]
- Dubska L, Literak I, Kocianova E, Taragel'ová V, Sychra O** (2009): Differential role of passerine birds in distribution of *Borrelia* spirochetes, based on data from ticks collected from birds during the postbreeding migration period in Central Europe. *Appl Environ Microbiol*; 75:596-602
- Duh D, Petrovec M, Avsic-Zupanc T** (2001): Diversity of *Babesia* Infecting European sheep ticks (*Ixodes ricinus*). *J Clin Microbiol*; 39:3395-3397
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR** (2001): Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*; 51:2145-2165
- Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ, Bakken JS** (2005): Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis*; 11:1828-1834
- Eisen L, Lane RS**: Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: Gray J, Kahl O, Lane RS, Stanek G (Hrsg) Lyme Borreliosis Biology, Epidemiology and Control, *CABI Publishing*, New York, 2002:91-115
- Elfving K, Olsen B, Bergstrom S, Waldenstrom J, Lundkvist A, Sjostedt A, Mejlom H, Nilsson K** (2010): Dissemination of spotted Fever rickettsia agents in europe by migrating birds. *PLoS ONE*; 5:e8572

- Estrada-Pena A, Osacar JJ, Pichon B, Gray JS** (2005): Hosts and Pathogen Detection for Immature Stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in North-Central Spain. *Exp Appl Acarol*; 37:257-268
- Fingerle V, Munderloh UG, Liegl G, Wilske B** (1999): Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Med Microbiol Immunol*; 188:145-149
- Fingerle V, Rauser S, Hammer B, Kahl O, Heimerl C, Schulte-Spechtel U, Gern L, Wilske B** (2002): Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected *Ixodes ricinus* Nymphs. *J Clin Microbiol*; 40:1456-1463
- Fingerle V, Michel H, Hettche G, Hizo-Teufel C, Wilske B** (2004): *Borrelia burgdorferi* s.l. OspA-types are widespread in Bavaria but show distinct local patterns. *Int J Med Microbiol*; 293:165-166
- Foldvari G, Farkas R, Lakos A** (2005): *Borrelia spielmanii* erythema migrans, Hungary. *Emerg Infect Dis*; 11:1794-1795
- Foppa IM, Krause PJ, Spielman A, Goethert H, Gern L, Brand B, Telford SR, 3rd** (2002): Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, eastern Switzerland. *Emerg Infect Dis*; 8:722-726
- Frandsen F, Bresciani J, Hansen HG** (1995): Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in Danish rodents. *Apmis*; 103:247-253
- Franke J**: Anwendung etablierter Methoden bei der Untersuchung saisonaler Unterschiede in der Transmission von *Borrelia burgdorferi* sensu lato - Genospezies durch Kleinsäuger. Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena 2005
- Franke J, Dorn W**: Suitability of ten commercial systems to extract *Borrelia burgdorferi* s.l. DNA from ticks. Tagungsbeitrag: IX International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Jena 2007
- Franke J, Kipp S, Flügel C, Dorn W** (2008): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in ticks feeding on humans in Thuringia/Germany. *Int J Med Microbiol*; 298 Suppl 1:188-192
- Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb J-F, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Watthey L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fujii C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC** (1997): Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*; 390:580-586
- Fukunaga M, Hamase A, Okada K, Nakao M** (1996): *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol Immunol*; 40:877-881
- Gassner F, Verbaarschot P, Smallegange RC, Spitzen J, Van Wieren SE, Takken W** (2008): Variations in *Ixodes ricinus* density and *Borrelia* infections associated with cattle introduced into a woodland in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol*; 74:7138-7144
- Gatewood AG, Liebman KA, Vourc'h G, Bunikis J, Hamer SA, Cortinas R, Melton F, Cislo P, Kitron U, Tsao J, Barbour AG, Fish D, Diuk-Wasser MA** (2009): Climate and tick seasonality are predictors of *Borrelia burgdorferi* genotype distribution. *Appl Environ Microbiol*; 75:2476-2483
- Gern L, Siegenthaler M, Hu CM, Leuba-Garcia S, Humair PF, Moret J** (1994): *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *Eur J Epidemiol*; 10:75-80
- Gern L, Rais O** (1996): Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*; 33:189-192



- Gern L** (2009): Life Cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Transmission to Humans. *Curr Probl Dermatol*; 37:18-30
- Gilbert L** (2009): Altitudinal patterns of tick and host abundance: a potential role for climate change in regulating tick-borne diseases? *Oecologia*; 162:217-225
- Gilmore RD, Jr., Mbow ML, Stevenson B** (2001): Analysis of *Borrelia burgdorferi* gene expression during life cycle phases of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Microbes Infect*; 3:799-808
- Ginsberg HS, Buckley PA, Balmforth MG, Zhioua E, Mitra S, Buckley FG** (2005): Reservoir competence of native North American birds for the lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Med Entomol*; 42:445-449
- Goddard J** (2003): Experimental infection of lone star ticks, *Amblyomma americanum* (L.), with *Rickettsia parkeri* and exposure of guinea pigs to the agent. *J Med Entomol*; 40:686-689
- Goethert HK, Telford SR, 3rd** (2003): What is *Babesia microti*? *Parasitology*; 127:301-309
- Goldstein SF, Charon NW, Kreiling JA** (1994): *Borrelia burgdorferi* swims with a planar waveform similar to that of eukaryotic flagella. *PNAS*; 91:3433-3437
- Gray JS** (1984): Studies on the dynamics of active populations of the sheep tick *Ixodes ricinus* L. in Co. Wicklow, Ireland. *Acarologia*; 25:167-178
- Gray JS** (1991): The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Rev Med Vet Entomol*; 79:323-333
- Gray JS, Kirstein F, Robertson JN, Stein J, Kahl O** (1999): *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. *Exp Appl Acarol*; 23:717-729
- Gray JS, von Stedingk LV, Gurtelschmid M, Granstrom M** (2002): Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and gerbils. *J Clin Microbiol*; 40:1259-1263
- Gray JS** (2004): *Babesia* sp.: emerging intracellular parasites in Europe. *Pol J Microbiol*; 53 Suppl:55-60
- Gray JS, Weiss LM**: *Babesia microti*. In: Khan N (Hrsg) Emerging protozoan pathogens, *Taylor and Francis*, Abingdon, UK, 2008:303-349
- Gray JS, Dautel H, Estrada-Pena A, Kahl O, Lindgren E** (2009): Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis*; 2009:593232
- Halos L, Jamal T, Maillard R, Beugnet F, Le Menach A, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M** (2005): Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. *Vet Res*; 36:79-87
- Hanincová K, Schafer SM, Etti S, Sewell HS, Taragel'ová V, Ziak D, Labuda M, Kurtenbach K** (2003a): Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology*; 126:11-20
- Hanincová K, Taragel'ová V, Koci J, Schafer SM, Hails R, Ullmann AJ, Piesman J, Labuda M, Kurtenbach K** (2003b): Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Appl Environ Microbiol*; 69:2825-2830
- Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P** (2004): Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int J Med Microbiol*; 293 Suppl 37:86-92
- Hefty PS, Jolliff SE, Caimano MJ, Wikel SK, Akins DR** (2002): Changes in temporal and spatial patterns of outer surface lipoprotein expression generate population heterogeneity and antigenic diversity in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*; 70:3468-3478
- Hengge UR, Tannapfel A, Tying SK, Erbel R, Arendt G, Ruzicka T** (2003): Lyme borreliosis. *Lancet Infect Dis*; 3:489-500

- Herwaldt BL, Caccio S, Gherlinzoni F, Aspöck H, Slemenda SB, Piccaluga P, Martinelli G, Edelhofer R, Hollenstein U, Poletti G, Pampiglione S, Loschenberger K, Tura S, Pieniazek NJ** (2003): Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis*; 9:942-948
- Hildebrandt A, Schmidt KH, Fingerle V, Wilske B, Straube E** (2002): Prevalence of granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany (Thuringia) detected by PCR and sequencing of a 16S ribosomal DNA fragment. *FEMS Microbiol Lett*; 211:225-230
- Hildebrandt A, Schmidt KH, Wilske B, Dorn W, Straube E, Fingerle V** (2003): Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks in central Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 22:364-367
- Hildebrandt A, Hunfeld KP, Baier M, Krumbholz A, Sachse S, Lorenzen T, Kiehntopf M, Fricke HJ, Straube E** (2007): First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 26:595-601
- Hildebrandt A, Pauliks K, Sachse S, Straube E** (2009a): *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies and coinfection with *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). *Proceedings of the X. International Jena Symposium on Tick-borne Diseases in Weimar*; p 181
- Hildebrandt A, Krämer A, Sachse S, Straube E** (2009b): Detection of *Rickettsia* spp. and coinfection with *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). *Proceedings of the X. International Jena Symposium on Tick-borne Diseases in Weimar*; p 179
- Hodzic E, Feng S, Freet KJ, Borjesson DL, Barthold SW** (2002): *Borrelia burgdorferi* population kinetics and selected gene expression at the host-vector interface. *Infect Immun*; 70:3382-3388
- Hofmann H** (2005): Lyme borreliosis. Cutaneous manifestation. *Hautarzt*; 56:783-795; quiz 796
- Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR, 3rd, Krause PJ, Persing DH** (2000): Babesiosis. *Clin Microbiol Rev*; 13:451-469
- Hornok S, Meli ML, Perreten A, Farkas R, Willi B, Beugnet F, Lutz H, Hofmann-Lehmann R** (2009): Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. *Vet Microbiol*; 140:98-104
- Hovius JW, Li X, Ramamoorthi N, van Dam AP, Barthold SW, van der Poll T, Speelman P, Fikrig E** (2007): Coinfection with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia garinii* alters the course of murine Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 49:224-234
- Hu CM, Wilske B, Fingerle V, Lobet Y, Gern L** (2001): Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. *J Clin Microbiol*; 39:1169-1171
- Hu CM, Cheminade Y, Perret JL, Weynants V, Lobet Y, Gern L** (2003): Early detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in Balb/c mice by co-feeding *Ixodes ricinus* ticks. *Int J Med Microbiol*; 293:421-426
- Huegli D, Hu CM, Humair PF, Wilske B, Gern L** (2002): *Apodemus* species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. *J Clin Microbiol*; 40:4735-4737
- Humair PF, Turrian N, Aeschliemann A, Gern L** (1993): *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootiologic contribution of small mammals. *Folia Parasitologica*; 40:65-70
- Humair PF, Rais O, Gern L** (1999): Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology*; 118 ( Pt 1):33-42
- Hummler SB**: Auswertung diagnostischer Verfahren bei Borrelienerkrankung. Dissertation, Philipps-Universität Marburg Marburg 2001

- Hunfeld K-P, Hildebrandt A, Gray JS (2008): Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol.*; 38:1219-1237
- Hunfeld KP, Lambert A, Kampen H, Albert S, Epe C, Brade V, Tenter AM (2002): Seroprevalence of *Babesia* infections in humans exposed to ticks in midwestern Germany. *J Clin Microbiol*; 40:2431-2436
- Hunfeld KP, Brade V (2004): Zoonotic *Babesia*: possibly emerging pathogens to be considered for tick-infested humans in Central Europe. *Int J Med Microbiol*; 293 Suppl 37:93-103
- Hyde FW, Johnson RC (1984): Genetic relationship of lyme disease spirochetes to *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira* spp. *J Clin Microbiol*; 20:151-154
- Ioannou I, Chochlakis D, Kasinis N, Anayiotos P, Lyssandrou A, Papadopoulos B, Tselentis Y, Psaroulaki A (2009): Carriage of *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* and *Anaplasma* spp. by endemic and migratory wild birds and their ectoparasites in Cyprus. *Clin Microbiol Infect*; [vorläufige elektronische Veröffentlichung, noch nicht im Druck]
- Jado I, Oteo JA, Aldamiz M, Gil H, Escudero R, Ibarra V, Portu J, Portillo A, Lezaun MJ, Garcia-Amil C, Rodriguez-Moreno I, Anda P (2007): *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerg Infect Dis*; 13:1405-1407
- Jensen J, Simon D, Murua Escobar H, Soller JT, Bullerdiek J, Beelitz P, Pfister K, Nolte I (2007): *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Zoonoses Public Health*; 54:94-101
- Jordan BE, Onks KR, Hamilton SW, Hayslette SE, Wright SM (2009): Detection of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia lonestari* in birds in Tennessee. *J Med Entomol*; 46:131-138
- Junttila J, Peltomaa M, Soini H, Marjamäki M, Viljanen MK (1999): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. *J Clin Microbiol*; 37:1361-1365
- Juricova Z, Halouzka J, Hubalek Z (2002): Serologic survey for antibodies to *Borrelia burgdorferi* in rodents and detection of spirochaetes in ticks and fleas in South Moravia (Czech Republic). *Biologia*; 57:383-387
- Kalman D, Sreter T, Szell Z, Egyed L (2003): *Babesia microti* infection of anthropophilic ticks (*Ixodes ricinus*) in Hungary. *Ann Trop Med Parasitol*; 97:317-319
- Kampen H, Rotzel DC, Kurtenbach K, Maier WA, Seitz HM (2004): Substantial rise in the prevalence of Lyme borreliosis spirochetes in a region of Western Germany over a 10-year period. *Appl Environ Microbiol*; 70:1576-1582
- Karbowiak G (2004): Zoonotic reservoir of *Babesia microti* in Poland. *Pol J Microbiol*; 53 Suppl:61-65
- Kawabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y (1993): Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol*; 37:843-848
- Kelly PJ, Mason PR (1991): Transmission of a spotted fever group rickettsia by *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*; 28:598-600
- Khanakah G, Kocianova E, Vyrostekova V, Rehacek J, Kundi M, Stanek G (2006): Seasonal variations in detecting *Borrelia burgdorferi* sensu lato in rodents from north eastern Austria. *Wien Klin Wochenschr*; 118:754-758
- Kipp S, Dorn W, Wilske B, Fingerle V (2006a): Heterogeneity in prevalence and genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in different localities in Thuringia, Germany. *Int J Med Microbiol*; 296 Suppl 1:119-121
- Kipp S, Goedecke A, Dorn W, Wilske B, Fingerle V (2006b): Role of birds in Thuringia, Germany, in the natural cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the Lyme disease spirochaete. *Int J Med Microbiol*; 296 Suppl 1:125-128
- Kipp S: Wirt-Vektor-Beziehungen und genetische Heterogenität von *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Borreliose Naturherden. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena 2008

- Kirstein F, Gray J** (1996): A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol*; 62:4060-4065
- Koči J, Movila A, Taragel'ová V, Toderas I, Uspenskaia I, Derdákóvá M, Labudá M** (2007): First report of *Anaplasma phagocytophilum* and its co-infections with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) from Republic of Moldova. *Exp Appl Acarol*; 41:147-152
- Koide S, Yang X, Huang X, Dunn JJ, Luft BJ** (2005): Structure-based design of a second-generation Lyme disease vaccine based on a C-terminal fragment of *Borrelia burgdorferi* OspA. *J Mol Biol*; 350:290-299
- Kölling C**: Forests under the influence of climate change—chances and limitations of adaptation in forestry. In: Lozán J, Graßl H, Jendritzky G, Karbe L, Reise K (Hrsg) Warning Signal Climate. Health Risks for Plants, Animals and Human Beings, *Wissenschaftliche Auswertungen*, Hamburg, 2008:357-361
- Korenberg EI** (2004): Problems in the study and prophylaxis of mixed infections transmitted by ixodid ticks. *Int J Med Microbiol*; 293 Suppl 37:80-85
- Kotlik P, Deffontaine V, Mascheretti S, Zima J, Michaux JR, Searle JB** (2006): A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103:14860-14864
- Kowalski J, Hopfenmuller W, Fingerle V, Malberg H, Eisenblatter M, Wagner J, Miksits K, Hahn H, Ignatius R** (2006): Seroprevalence of human granulocytic anaplasmosis in Berlin/Brandenburg, Germany: an 8-year survey. *Clin Microbiol Infect*; 12:924-927
- Krause PJ, Telford SR, 3rd, Pollack RJ, Ryan R, Brassard P, Zemel L, Spielman A** (1992): Babesiosis: an underdiagnosed disease of children. *Pediatrics*; 89:1045-1048
- Krause PJ, Telford SR, 3rd, Spielman A, Sikand V, Ryan R, Christianson D, Burke G, Brassard P, Pollack R, Peck J, Persing DH** (1996): Concurrent Lyme disease and babesiosis. Evidence for increased severity and duration of illness. *JAMA*; 275:1657-1660
- Krause PJ, Spielman A, Telford SR, 3rd, Sikand VK, McKay K, Christianson D, Pollack RJ, Brassard P, Magera J, Ryan R, Persing DH** (1998): Persistent parasitemia after acute babesiosis. *N Engl J Med*; 339:160-165
- Krause PJ, McKay K, Thompson CA, Sikand VK, Lentz R, Lepore T, Closter L, Christianson D, Telford SR, Persing D, Radolf JD, Spielman A** (2002): Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. *Clin Infect Dis*; 34:1184-1191
- Krause PJ, Daily J, Telford SR, Vannier E, Lantos P, Spielman A** (2007): Shared features in the pathobiology of babesiosis and malaria. *Trends Parasitol*; 23:605-610
- Kurtenbach K, Dizij A, Seitz HM, Margos G, Moter SE, Kramer MD, Wallich R, Schaible UE, Simon MM** (1994): Differential immune responses to *Borrelia burgdorferi* in European wild rodent species influence spirochete transmission to *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). *Infect Immun*; 62:5344-5352
- Kurtenbach K, Kampen H, Dizij A, Arndt S, Seitz HM, Schaible UE, Simon MM** (1995): Infestation of rodents with larval *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) is an important factor in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* s.l. in German woodlands. *J Med Entomol*; 32:807-817
- Kurtenbach K, Sewell H-S, Ogden NH, Randolph SE, Nuttall PA** (1998a): Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infect Immun*; 66:1248-1251
- Kurtenbach K, Peacey M, Rijpkema SGT, Hoodless N, Nuttall PA, Randolph SE** (1998b): Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl Environ Microbiol*; 64:1169-1174

- Kurtenbach K, De Michelis S, Sewell H-S, Etti S, Schafer SM, Hails R, Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Hanincová K, Labuda M, Bormane A, Donaghy M (2001): Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl. Environ. Microbiol.*; 67:4926-4929
- Kurtenbach K, Schäfer SM, de Michaelis S, Etti S, Sewell HS: *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the vertebrate host. In: Gray J, Kahl O, Lane RS, Stanek G (Hrsg) Lyme Borreliosis Biology, Epidemiology and Control, CABI Publishing, New York, 2002a:117-148
- Kurtenbach K, De Michelis S, Etti S, Schafer SM, Sewell HS, Brade V, Kraiczy P (2002b): Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato - the key role of host complement. *Trends Microbiol.*; 10:74-79
- Kurtenbach K, De Michelis S, Sewell HS, Etti S, Schafer SM, Holmes E, Hails R, Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Hanincová K, Labuda M, Bormane A, Donaghy M (2002c): The key roles of selection and migration in the ecology of Lyme borreliosis. *Int J Med Microbiol.*; 291 Suppl 33:152-154
- Kuzna-Grygiel W, Bukowska K, Cichocka A, Kosik-Bogacka D, Skotarczak B (2002): The prevalence of piroplasms in a population of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) from north-western Poland. *Ann Agric Environ Med*; 9:175-178
- Kybicova K, Kurzova Z, Hulinska D (2008): Molecular and serological evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in wild rodents in the Czech Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis*; 8:645-652
- Ladbury GA, Stuenkel S, Thomas R, Bown KJ, Woldehiwet Z, Granquist EG, Bergstrom K, Birtles RJ (2008): Dynamic transmission of numerous *Anaplasma phagocytophilum* genotypes among lambs in an infected sheep flock in an area of anaplasmosis endemicity. *J Clin Microbiol.*; 46:1686-1691
- Lawrie CH, Nuttall PA (2001): Antigenic profile of *Ixodes ricinus*: effect of developmental stage, feeding time and the response of different host species. *Parasite Immunol.*; 23:549-556
- Lenčáková D, Hizo-Teufel C, Petko B, Schulte-Spechtel U, Stanko M, Wilske B, Fingerle V (2006): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. OspA types in *Ixodes ricinus* ticks from selected localities in Slovakia and Poland. *Int J Med Microbiol.*; 296 Suppl 40:108-118
- Lenčáková D, Fingerle V, Derdaková M, Hizo Teufel C, Pet'ko B, Schulte-Spechtel U, Stanko M, Wilske B: Diversity of *Borrelia burgdorferi* s.l. species and OspA-types in *Ixodes ricinus* ticks from Slovakia and Poland. Tagungsbeitrag: IX International Jena Symposium, Jena 2007
- Leschnik MW, Kirtz G, Tichy A, Leidinger E (2008): Seasonal occurrence of canine babesiosis is influenced by local climate conditions. *Int J Med Microbiol.*; 298, Suppl 1:243-248
- Levin ML, Fish D (2000a): Acquisition of coinfection and simultaneous transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* ticks. *Infect Immun.*; 68:2183-2186
- Levin ML, Fish D (2000b): Immunity reduces reservoir host competence of *Peromyscus leucopus* for *Ehrlichia phagocytophila*. *Infect Immun.*; 68:1514-1518
- Levy SA, Lissman BA, Ficke CM (1993): Performance of a *Borrelia burgdorferi* bacterin in borreliosis-endemic areas. *J Am Vet Med Assoc*; 202:1834-1838
- Liebisch A: Biologie und Ökologie der Zecken. In: Horst H (Hrsg) Einheimische Zeckenborreliose (Lyme Krankheit) bei Mensch und Tier, 1. Auflage, *Perimed-spitta.*, Nürnberg, 1991:31-47
- Lindgren E, Talleklint L, Polfeldt T (2000): Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Perspect.*; 108:119-123
- Liz JS, Anderes L, Sumner JW, Massung RF, Gern L, Rutti B, Brossard M (2000): PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J Clin Microbiol.*; 38:1002-1007

- Liz JS** (2002): Ehrlichiosis in *Ixodes ricinus* and wild mammals. *Int J Med Microbiol*; 291 Suppl 33:104-105
- Liz JS, Sumner JW, Pfister K, Brossard M** (2002): PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). *J Clin Microbiol*; 40:892-897
- Lucius R, Loos-Frank B** (Hrsg): Parasitologie: Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, 1997
- Lünemann JD, Krause A** (2003): Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi*: etiopathogenetic relevance and clinical implications. *Z Rheumatol*; 62:148-154
- Majlathová V, Majlath I, Derdáková M, Vichova B, Pet'ko B** (2006): *Borrelia lusitaniae* and green lizards (*Lacerta viridis*), Karst Region, Slovakia. *Emerg Infect Dis*; 12:1895-1901
- Marconi RT, Liveris D, Schwartz I** (1995): Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J Clin Microbiol*; 33:2427-2434
- Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Wilske B, Bormane A, Vitorino L, Collares-Pereira M, Drancourt M, Kurtenbach K** (2009): MLSA on housekeeping genes defines a new *Borrelia* species. *Appl Environ Microbiol*; 75:5410-5416
- Marquez FJ** (2008): Spotted fever group *Rickettsia* in ticks from southeastern Spain natural parks. *Exp Appl Acarol*; 45:185-194
- Marquez FJ** (2009): Rickettsiae in ticks from wild ungulates of Sierra Nevada and Donana national parks (Spain). *Clin Microbiol Infect*; [vorläufige elektronische Veröffentlichung, noch nicht im Druck]
- Marquez FJ, Millan J** (2009): Rickettsiae in ticks from wild and domestic carnivores of Donana National Park (Spain) and surrounding area. *Clin Microbiol Infect*; [vorläufige elektronische Veröffentlichung, noch nicht im Druck]
- Masuzawa T, Komikado T, Iwaki A, Suzuki H, Kaneda K, Yanagihara Y** (1996): Characterization of *Borrelia* sp. isolated from *Ixodes tanuki*, *I. turdus*, and *I. columnae* in Japan by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *FEMS Microbiol Lett*; 142:77-83
- Masuzawa T, Takada N, Kudeken M, Fukui T, Yano Y, Ishiguro F, Kawamura Y, Imai Y, Ezaki T** (2001): *Borrelia sinica* sp. nov., a lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int J Syst Evol Microbiol*; 51:1817-1824
- Masuzawa T** (2004): Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia. *Jpn J Infect Dis*; 57:229-235
- Materna J, Daniel M, Danielova V** (2005): Altitudinal distribution limit of the tick *Ixodes ricinus* shifted considerably towards higher altitudes in central Europe: results of three years monitoring in the Krkonose Mts. (Czech Republic). *Cent Eur J Public Health*; 13:24-28
- Matuschka FR, Fischer P, Heiler M, Blumcke S, Spielman A** (1992): Stage-associated risk of transmission of the Lyme disease spirochete by European *Ixodes* ticks. *Parasitol Res*; 78:695-698
- Mehnert WH** (2005): Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland: Neuerkrankungen an Lyme-Borreliose im Jahr 2004 Analyse auf der Basis der Meldedaten aus den sechs östlichen Bundesländern. *RKI - Epidemiolog Bull*; 32:285-288
- Messutat S**: Untersuchungen zur Prävalenz von Borrelien bei *Ixodes ricinus* L. (Acari Ixodidae), die an Kleinsäugetern (Insectivora et Rodentia) parasitierten. *Dipl Friedrich-Schiller-Universität Jena* 1999

- Michalik J, Hofman T, Buczek A, Skoracki M, Sikora B** (2003): *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks collected from vegetation and small rodents in recreational areas of the city of Poznan. *J Med Entomol*; 40:690-697
- Michel H, Wilske B, Hettche G, Gottner G, Heimerl C, Reischl U, Schulte-Spechtel U, Fingerle V** (2003): An *ospA*-polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism-based method for sensitive detection and reliable differentiation of all European *Borrelia burgdorferi* sensu lato species and *OspA* types. *Med Microbiol Immunol*; 193:219-226
- Mielke M, Hahn H**: Borrelien. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann H (Hrsg) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 4. Auflage, *Springer Verlag*, Berlin, Heidelberg, New York, 2001:411-418
- Motaleb MA, Corum L, Bono JL, Elias AF, Rosa P, Samuels DS, Charon NW** (2000): *Borrelia burgdorferi* periplasmatic flagella have both skeletal and motility functions. *PNAS*; 91:3433-3437
- Nadelman RB, Horowitz HW, Hsieh TC, Wu JM, Agüero-Rosenfeld ME, Schwartz I, Nowakowski J, Varde S, Wormser GP** (1997): Simultaneous human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis. *N Engl J Med*; 337:27-30
- Nassal M, Skamel C, Kratz PA, Wallich R, Stehle T, Simon MM** (2005): A fusion product of the complete *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (*OspA*) and the hepatitis B virus capsid protein is highly immunogenic and induces protective immunity similar to that seen with an effective lipidated *OspA* vaccine formula. *Eur J Immunol*; 35:655-665
- Nau R, Christen HJ, Eiffert H** (2009): Lyme disease - current state of knowledge. *Dtsch Arztebl Int*; 106:72-81
- Nilsson K, Lindquist O, Pahlson C** (1999a): Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet*; 354:1169-1173
- Nilsson K, Lindquist O, Liu AJ, Jaenson TG, Friman G, Pahlson C** (1999b): *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. *J Clin Microbiol*; 37:400-403
- Nilsson K, Pahlson C, Lukinius A, Eriksson L, Nilsson L, Lindquist O** (2002): Presence of *Rickettsia helvetica* in granulomatous tissue from patients with sarcoidosis. *J Infect Dis*; 185:1128-1138
- Normant BR, Burgdorfer W** (1984): Susceptibility and reservoir potential of the dog to spotted fever-group rickettsiae. *Am J Vet Res*; 45:1706-1710
- Ogden NH, Bown K, Horrocks BK, Woldehiwet Z, Bennett M** (1998): Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Med Vet Entomol*; 12:423-429
- Olano JP, Walker DH** (2002): Human ehrlichioses. *Med Clin North Am*; 86:375-392
- Oleson CV, Sivalingam JJ, O'Neill BJ, Staas WE, Jr.** (2003): Transverse myelitis secondary to coexistent Lyme disease and babesiosis. *J Spinal Cord Med*; 26:168-171
- Olsen B, Jaenson T, Bergstrom S** (1995a): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Appl Environ Microbiol*; 61:3082-3087
- Olsen B, Duffy DC, Jaenson TG, Gylfe A, Bonnedahl J, Bergstrom S** (1995b): Transhemispheric exchange of Lyme disease spirochetes by seabirds. *J Clin Microbiol*; 33:3270-3274
- Owen DC** (2006): Is Lyme disease always poly microbial? - The jigsaw hypothesis. *Med Hypotheses*; 67:860-864
- Park J, Choi KS, Dumler JS** (2003): Major surface protein 2 of *Anaplasma phagocytophilum* facilitates adherence to granulocytes. *Infect Immun*; 71:4018-4025
- Parola P, Davoust B, Raoult D** (2005a): Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res*; 36:469-492

- Parola P, Paddock CD, Raoult D** (2005b): Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev*; 18:719-756
- Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier PE, Sotto A, Labauge P, Raoult D** (2008): Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis*; 2:e338
- Paulauskas A, Radzijeuskaja J, Rosef O** (2009): *Anaplasma* in ticks feeding on migrating birds and questing ticks in Lithuania and Norway. *Clin Microbiol Infect*; [vorläufige elektronische Veröffentlichung, noch nicht im Druck]
- Pawelczyk A, Siński E** (2000): Prevalence of IgG antibodies response to *Borrelia burgdorferi* s.l. in populations of wild rodents from Mazury lakes district region of Poland. *Ann Agric Environ Med*; 7:79-83
- Peirce MA** (2000): A taxonomic review of avian piroplasms of the genus *Babesia* Starcovici, 1893 (Apicomplexa: Piroplasmorida: Babesiidae). *J Natural History*; 34:317 - 332
- Peirce MA** (2005): A checklist of the valid avian species of *Babesia* (Apicomplexa: Piroplasmorida), *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida), and *Hepatozoon* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). *J Natural History*; 39:3621–3632
- Piccolin G, Benedetti G, Doglioni C, Lorenzato C, Mancuso S, Papa N, Pitton L, Ramon MC, Zasio C, Bertiato G** (2006): A study of the presence of *B. burgdorferi*, *Anaplasma* (previously *Ehrlichia*) *phagocytophilum*, *Rickettsia*, and *Babesia* in *Ixodes ricinus* collected within the territory of Belluno, Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*; 6:24-31
- Pichon B, Egan D, Rogers M, Gray J** (2003): Detection and identification of pathogens and host DNA in unfed host-seeking *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*; 40:723-731
- Pichon B, Rogers M, Egan D, Gray J** (2005): Blood-meal analysis for the identification of reservoir hosts of tick-borne pathogens in Ireland. *Vector Borne Zoonotic Dis*; 5:172-180
- Pichon B, Kahl O, Hammer B, Gray JS** (2006): Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. *Vector Borne Zoonotic Dis*; 6:382-387
- Postic D, Ras NM, Lane RS, Hendson M, Baranton G** (1998): Expanded diversity among Californian *borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J Clin Microbiol*; 36:3497-3504
- Postic D, Garnier M, Baranton G** (2007): Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates - description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *Int J Med Microbiol*; 297:263-271
- Poupon M-A, Lommano E, Humair PF, Douet V, Rais O, Schaad M, Jenni L, Gern L** (2006): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl Environ Microbiol*; 72:976-979
- Radzijeuskaja J, Paulauskas A, Rosef O** (2008): Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia divergens* in *Ixodes ricinus* ticks from Lithuania and Norway. *Int J Med Microbiol*; 298, Suppl 1:218-221
- Randolph SE** (2001): The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe *Phil Trans R Soc Lond*; 356:1045-1056
- Raoult D, Roux V** (1997): Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*; 10:694-719
- Rauter C, Oehme R, Diterich I, Engele M, Hartung T** (2002): Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. *J Clin Microbiol*; 40:36-43
- Rauter C, Hartung T** (2005): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl. Environ. Microbiol.*; 71:7203-7216
- Reed KD, Meece JK, Henkel JS, Shukla SK** (2003): Birds, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. *Clin Med Res*; 1:5-12



- Rehacek J** (1984): *Rickettsia slovaca*, the organism and its ecology. *Acta Sci Nat Brno*; 18:1-50
- Richter D, Schlee DB, Allgower R, Matuschka FR** (2004): Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl Environ Microbiol*; 70:6414-6419
- Richter D, Matuschka FR** (2006): Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizards. *Appl Environ Microbiol*; 72:4627-4632
- Rikihisa Y** (1991): The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev*; 4:286-308
- Rosef O, Paulauskas A, Radzijeuskaja J** (2009): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks in relation to the density of wild cervids. *Acta Vet Scand*; 51:47
- Rudakov N, Samoilenko I, Yakimemko VV, Reshetnikova TA, Shpynov S, Walker DH, Tankibaev M**: The re-emergence of Siberian tick typhus: field and experimental observations. In: Raoult D, Brouqui P (Hrsg) Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millenium, *Elsevier*, Paris, Frankreich, 1999:269-273
- Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH, Jr.** (2009a): *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States. *J Clin Microbiol*; 47:134-141
- Rudenko N, Golovchenko M, Lin T, Gao L, Grubhoffer L, Oliver JH, Jr.** (2009b): Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp. nov. *J Clin Microbiol*; 47:3875-3880
- Rudolf I, Golovchenko M, Sikutova S, Rudenko N, Grubhoffer L, Hubalek Z** (2005): *Babesia microti* (Piroplasmida: Babesiidae) in nymphal *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the Czech Republic. *Folia Parasitol (Praha)*; 52:274-276
- Santos-Silva MM, Sousa R, Santos AS, Melo P, Encarnacao V, Bacellar F** (2006): Ticks parasitizing wild birds in Portugal: detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. helvetica* and *R. massiliae*. *Exp Appl Acarol*; 39:331-338
- Schaarschmidt D, Oehme R, Kimmig P, Hesch RD, Englisch S** (2001): Detection and molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and in different patient samples from southwest Germany. *Eur J Epidemiol*; 17:1067-1074
- Schneider E** (1995): Diagnostik der Lyme-Borreliose. *Versicherungsmedizin*; 47:75-79
- Schriefer ME, Azad AF**: Changing ecology of Rocky Mountain spotted fever. In: Sonenshine DE, Mather TN (Hrsg) Ecological dynamics of tick-borne zoonoses, *Oxford University Press*, New York, NY, USA, 1994:314-326
- Scorpio DG, Caspersen K, Ogata H, Park J, Dumler JS** (2004): Restricted changes in major surface protein-2 (msp2) transcription after prolonged in vitro passage of *Anaplasma phagocytophilum*. *BMC Microbiol*; 4:1
- Seedat J, Marcus U, Kiehl W, Fehrmann S** (2007): Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland: Lyme-Borreliose: Zur Situation in den östlichen Bundesländern Analyse der Meldedaten aus dem 5-Jahreszeitraum von 2002 bis 2006. *RKI - Epidemiol Bull*; 38:351-358
- Silaghi C, Gilles J, Hohle M, Fingerle V, Just FT, Pfister K** (2008a): *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Dis*; 14:972-974
- Silaghi C, Gilles J, Hohle M, Pradel I, Just FT, Fingerle V, Kuchenhoff H, Pfister K** (2008b): Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. *J Med Entomol*; 45:948-955
- Siński E, Pawełczyk A, Bajer A, Behnke J** (2006a): Abundance of wild rodents, ticks and environmental risk of Lyme borreliosis: a longitudinal study in an area of Mazury Lakes district of Poland. *Ann Agric Environ Med*; 13:295-300

- Siński E, Bajer A, Welc R, Pawelczyk A, Ogrzewalska M, Behnke JM** (2006b): *Babesia microti*: Prevalence in wild rodents and *Ixodes ricinus* ticks from the Mazury Lakes District of north-eastern Poland. *Int J Med Microbiol*; 296, Suppl 1:137–143
- Skarphedinsson S, Lyholm BF, Ljungberg M, Sogaard P, Kolmos HJ, Nielsen LP** (2007): Detection and identification of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia helvetica* in Danish *Ixodes ricinus* ticks. *Apmis*; 115:225-230
- Skotarczak B, Cichocka A** (2001): Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. *Ann Agric Environ Med*; 8:187-189
- Skotarczak B, Wodecka B, Cichocka A** (2002): Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland. *Ann Agric Environ Med*; 9:25-28
- Skotarczak B, Sawczuk M** (2003): Occurrence of *Babesia microti* in ticks *Ixodes ricinus* on selected areas of western Pomerania. *Wiad Parazytol*; 49:273-280
- Skotarczak B, Rymaszewska A, Wodecka B, Sawczuk M** (2003): Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. *J Parasitol*; 89:194-196
- Skotarczak B, Rymaszewska A, Wodecka B, Sawczuk M, Adamska M, Maciejewska A** (2006): PCR detection of granulocytic *Anaplasma* and *Babesia* in *Ixodes ricinus* ticks and birds in west-central Poland. *Ann Agric Environ Med*; 13:21-23
- Skotarczak B** (2009): Adaptation factors of *Borrelia* for host and vector. *Ann Agric Environ Med*; 16:1-8
- Skrabalo Z, Deanovic Z** (1957): Piroplasmosis in man; report of a case. *Doc Med Geogr Trop*; 9:11-16
- Smetanova K, Burri C, Perez D, Gern L, Kocianova E** (2007): Detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in ticks from three different regions in Slovakia. *Wien Klin Wochenschr*; 119:534-537
- Spitalska E, Literak I, Sparagano OA, Golovchenko M, Kocianova E** (2006): Ticks (Ixodidae) from passerine birds in the Carpathian region. *Wien Klin Wochenschr*; 118:759-764
- Spitalska E, Boldis V, Kostanova Z, Kocianova E, Stefanidesova K** (2008): Incidence of various tick-borne microorganisms in rodents and ticks of central Slovakia. *Acta Virol*; 52:175-179
- Sprong H, Wielinga PR, Fonville M, Reusken C, Brandenburg AH, Borgsteede F, Gaasenbeek C, van der Giessen JW** (2009): *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasit Vectors*; 2:41
- Sreter-Lancz Z, Sreter T, Szell Z, Egyed L** (2005): Molecular evidence of *Rickettsia helvetica* and *R. monacensis* infections in *Ixodes ricinus* from Hungary. *Ann Trop Med Parasitol*; 99:325-330
- Stafford KC, Kitron U**: Environmental management for Lyme borreliosis control. In: Gray J, Kahl O, Lane RS, Stanek G (Hrsg) Lyme borreliosis biology, epidemiology and control, CABI Publishing, New York, 2002:306
- Stanczak J, Gabre RM, Kruminis-Lozowska W, Racewicz M, Kubica-Biernat B** (2004): *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann Agric Environ Med*; 11:109-114
- Stanczak J** (2006): The occurrence of Spotted Fever Group (SFG) Rickettsiae in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in northern Poland. *Ann N Y Acad Sci*; 1078:512-514
- Stanczak J, Racewicz M, Cieniuch S, Michalik J, Sikora B** (2009): Prevalence of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) paratizing small rodents. *Proceedings of the X. International Jena Symposium on Tick-borne Diseases in Weimar*; p 71

- Stanek G, Burger I, Hirschl A, Wewalka G, Radda A** (1986): *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle. Studies on laboratory animals. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*; 263:29-33
- Stanek G, Strle F, Gray J, Wormser GP**: History and characteristics of Lyme borreliosis. In: Gray J, Kahl O, Lane RS, Stanek G (Hrsg) *Lyme borreliosis biology, epidemiology and control*, CABI Publishing, New York, 2002:5-16
- Stanek G, Strle F** (2003): Lyme borreliosis. *Lancet*; 362:1639-1647
- Stanek G** (2009): Büchse der Pandora: Krankheitserreger in *Ixodes ricinus*-Zecken in Mitteleuropa. *Wien Klin Wochenschr*; 121:673-683
- Štefančíková A, Bhide M, Pet'ko B, Stanko M, Mosansky L, Fricova J, Derdáková M, Trávníček M** (2004): Anti-*Borrelia* antibodies in rodents: important hosts in ecology of Lyme disease. *Ann Agric Environ Med*; 11:209-213
- Štefančíková A, Derdáková M, Lenčáková D, Ivanová R, Stanko M, Čisláková L, Petko B** (2008): Serological and molecular detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Anaplasmataceae in rodents. *Folia Microbiol (Praha)*; 53:493-499
- Steil B**: Die genetische Heterogenität von *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ausgewählten Naturherden Deutschlands. Dissertation, *Friedrich-Schiller-Universität Jena* 2002
- Stern C, Kaiser A, Maier WA, Kampen H** (2006): Die Rolle von Amsel (*Turdus merula*), Rotdrossel (*Turdus iliacus*) und Singdrossel (*Turdus philomelos*) als Blutwirte für Zecken (Acari: Ixodidae) und Reservoirwirte für vier Genospezies des *Borrelia burgdorferi*-Artenkomplexes. *Mitt Dtsch Ges Allg Angew Ent*; 15:349-356
- Sudfeldt C, Dröschmeister R, Grüneberg G, Jaehne S, Mitschke A, Wahl J** (Hrsg): Vögel in Deutschland – 2008. *DDA, BfN, LAG VSW*, Münster, 2008
- Süss J** (2003): Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*; 21 Suppl 1:19-35
- Süss J, Fingerle V, Hunfeld K-P, Schrader C, Wilske B** (2004): Durch Zecken übertragene humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa. Teil II: Bakterien, Parasiten und Mischinfektionen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*; 47:470 - 486
- Süss J, Klaus C, Dorn W, Hesse G** (2006): Verbreitungsgebiete des Gemeinen Holzbocks (*Ixodes ricinus*) und Epidemiologie der Lyme-Borreliose und der FSME in Thüringen. *Arzteblatt Thüringen*; 17:222-224
- Süss J, Klaus C, Gerstengarbe FW, Werner PC** (2008): What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases. *J Travel Med*; 15:39-45
- Swanson SJ, Neitzel D, Reed KD, Belongia EA** (2006): Coinfections acquired from *Ixodes ticks*. *Clin Microbiol Rev*; 19:708-727
- Talaska T** (2004): Neue „tick-born diseases“ in Mitteleuropa: Infektionen mit *Rickettsia slovaca* und *Rickettsia helvetica*. *Brandenb Ärztebl*; 3:88-89
- Talaska T** (2009): *Dermacentor reticulatus* als potenzieller Überträger von Infektionen beim Menschen. *RKI-Epidemiol Bull*; 29:275
- Tälleklint L, Jaenson TG** (1995): Is the small mammal (*Clethrionomys glareolus*) or the tick vector (*Ixodes ricinus*) the primary overwintering reservoir for the Lyme borreliosis spirochete in Sweden? *J Wildl Dis*; 31:537-540
- Tampieri MP, Galuppi R, Bonoli C, Cancrini G, Moretti A, Pietrobelli M** (2008): Wild ungulates as *Babesia* hosts in northern and central Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis*; 8:667-674
- Taragel'ová V, Koči J, Hanincová K, Kurtenbach K, Derdáková M, Ogden NH, Literak I, Kocianová E, Labuda M** (2008): Blackbirds and song thrushes constitute a key reservoir of *Borrelia garinii*, the causative agent of borreliosis in Central Europe. *Appl Environ Microbiol*; 74:1289-1293

- Thomas V, Anguita J, Barthold SW, Fikrig E** (2001): Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis alters murine immune responses, Pathogen Burden, and Severity of Lyme Arthritis. *Infect Immun*; 69:3359-3371
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG** (1997): The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*; 25:4876-4882
- Trávníček M, Štefánčíková A, Nadzamová D, Stanko M, Čisláková L, Pet'ko B, Mardzinová S, Bhide M** (2003): Immunoglobulin G antibodies to *Borrelia burgdorferi* in game animals and small mammals in eastern Slovakia. *Rev Sci Tech*; 22:1035-1041
- van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh BM, Spanjaard L, Ramselaar ASP, Kramer MD, Dankert J** (1993): Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis*; 17:708-717
- Vostal K, Zakovska A** (2003): Two-year study of examination of blood from wild rodents for the presence of antiborrelial antibodies. *Ann Agric Environ Med*; 10:203-206
- Walker DH, Valbuena GA, Olano JP** (2003): Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. *Ann N Y Acad Sci*; 990:1-11
- Wang G, van Dam AP, Le Fleche A, Postic D, Peter O, Baranton G, de Boer R, Spanjaard L, Dankert J** (1997): Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int J Syst Bacteriol*; 47:926-932
- Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J** (1999): Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*; 12:633-653
- Wojcik-Fatla A, Cisak E, Chmielewska-Badora J, Zwolinski J, Buczek A, Dutkiewicz J** (2006): Prevalence of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from Lublin region (eastern Poland). *Ann Agric Environ Med*; 13:319-322
- Wojcik-Fatla A, Szymanska J, Wdowiak L, Buczek A, Dutkiewicz J** (2009): Coincidence of three pathogens (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*) in *Ixodes ricinus* ticks in the Lublin macroregion. *Ann Agric Environ Med*; 16:151-158
- Wölfel R, Terzioglu R, Kiessling J, Wilhelm S, Essbauer S, Pfeffer M, Dobler G** (2006): *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Bavaria, Germany. *Ann N Y Acad Sci*; 1078:509-511
- Wright SA, Thompson MA, Miller MJ, Knerl KM, Elms SL, Karpowicz JC, Young JF, Kramer VL** (2000): Ecology of *Borrelia burgdorferi* in ticks (Acari: Ixodidae), rodents, and birds in the Sierra Nevada foothills, Placer County, California. *J Med Entomol*; 37:909-918
- Zeman P, Januska J** (1999): Epizootiologic background of dissimilar distribution of human cases of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in a joint endemic area. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*; 22:247-260
- Zhioua E, Aeschlimann A, Gern L** (1994): Infection of field-collected *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) larvae with *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. *J Med Entomol*; 31:763-766

## Anhang

### GenBank-Zugriffsnummern der Referenzsequenzen

Spezies	Isolat	Accession Number
<i>B. burgdorferi</i>	PKa	X80182
<i>B. burgdorferi</i>	PBre	X85739
<i>B. afzelii</i>	PKo	S48322
<i>B. afzelii</i>	Plud	X85439
<i>B. bavariensis</i>	PBi	S48323
<i>B. garinii</i> OspA Typ 3	PBr	X80256
<i>B. garinii</i> OspA Typ 5	PHei	X80251
<i>B. garinii</i> OspA Typ 6	TN	X80252
<i>B. garinii</i> OspA Typ 6	PWudll	X80253
<i>B. garinii</i> OspA Typ 7	T25	X80254
<i>B. garinii</i> OspA Typ 8	CL1	AF227315
<i>B. valaisiana</i> Subtyp I	VS116	AF095940
<i>B. valaisiana</i> Subtyp II	NE231	AJ249467
<i>B. valaisiana</i> Subtyp II	M53	AF095947
<i>B. spielmanii</i>	A14S	AF102057
<i>B. lusitaniae</i>	PotiB2	Y10838
<i>A. phagocytophilum</i>	Jena8	AJ313513
<i>R. monacensis</i>	IrR/Munich	DQ100163
<i>R. helvetica</i>	Ip-4	DQ131912
<i>Ba. divergens</i>	(unbenannt)	AY789076
<i>Ba. microti</i>	Gray	AY693840

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Wolfram Dorn nicht nur für die Möglichkeit, meine Dissertation in seinem Lehrbereich anzufertigen, sondern auch für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und die Betreuung bei der Erstellung des Manuskriptes bedanken.

Mein Dank gilt auch Charlotte Flügel, denn ohne ihre Unterstützung und nicht zu vergessen, die gute Verpflegung, wären vor allem die Freilandarbeiten nicht möglich gewesen.

Dr. Andreas Goedecke vom ProRing e.V. und den Mitgliedern des Jordsand e.V. danke ich für die Bereitstellung der Vogelzecken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Anke Hildebrandt und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eberhard Straube für die ausgezeichnete und unkomplizierte Zusammenarbeit bedanken.

PD Dr. Michael Glei danke ich für die Möglichkeit der Mitbenutzung des Geldokumentationssystems.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mich während des gesamten Studiums und der anschließenden Promotion immer unterstützt und in den letzten Wochen verständnisvoll entbehrt hat. Vor allem aber möchte ich meiner Lebensgefährtin Franziska für ihre Geduld und Liebe in den vielen Jahren danken, die auch die Distanz zwischen Karlsruhe und Jena überwunden hat.

## Publikationen und Tagungsbeiträge

### Publikationen

- Franke J, Kipp S, Flügel C, Dorn W** (2008): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in ticks feeding on humans in Thuringia/Germany. *Int J Med Microbiol*; 298 Suppl 1:188-192
- Hildebrandt A, Franke J, Meier F, Sachse S, Dorn W, Straube E** (2010): The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp.. (akzeptiert von *TTBDis* am 16. Dezember 2009)
- Franke J, Moldenhauer A, Hildebrandt A, Dorn W** (2010): Are birds reservoir hosts for *Borrelia afzelii*? (akzeptiert von *TTBDis* am 08. März 2010)
- Franke J, Meier F, Moldenhauer A, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A** (2010): Established and emerging pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected from birds on a conservation island in the Baltic Sea. (akzeptiert von *Med Vet Entomol* am 25. März 2010)
- Hildebrandt A, Fritsch J, Franke J, Sachse S, Dorn W, Straube E** Co-circulation of emerging tick-borne pathogens in Middle Germany. (akzeptiert von *Vector Borne Zoonotic Dis* am 09. April 2010)

### Abstracts und Vorträge

- Franke J, Kipp S, Steil B, Sünder U, Flügel C, Fingerle V, Dorn W**: Seasonal patterns in the occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in free living ticks in Thuringia (Germany) determined by two different methods. Poster: 10<sup>th</sup> International Conference on Lyme Borreliosis and Other Tick-Borne Diseases, Wien, September 2005
- Franke J, Dorn W**: Suitability of ten commercial systems to extract *Borrelia burgdorferi* s.l. DNA from ticks. Poster: IX. International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Jena, März 2007
- Franke J, Moldenhauer A, Hildebrandt A, Dorn W**: Are birds reservoir hosts for *Borrelia afzelii*? Poster: 11th International Conference on Lyme Borreliosis and Other Tick-borne Diseases, Irvine/CA, USA, Oktober 2008
- Franke J, Meier F, Moldenhauer A, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A**: *Borrelia*, *Anaplasma*, *Rickettsia* and *Babesia* species in *Ixodes ricinus* ticks, collected from birds on a conservation island in the Baltic Sea. Poster: 61. Jahrestagung der DGHM, Göttingen, September 2009
- Hildebrandt A, Fritsch J, Franke J, Sachse S, Dorn W, Straube E**: Interesting insights into the co-circulation of pathogens in *Ixodes ricinus* ticks from rodents, birds and in questing stages in Middle Germany. Poster: 20<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Wien, April 2010
- Franke J, Kipp S, Flügel Ch, Dorn W**: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in ticks feeding on humans in Thuringia (Germany). Vortrag: IX. International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Jena, März 2007
- Franke J, Meier F, Moldenhauer A, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A**: *Borrelia*, *Anaplasma*, *Rickettsia* and *Babesia* species in *Ixodes ricinus* ticks, collected from birds on a conservation island in the Baltic Sea. Vortrag: X. International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Weimar, März 2009

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Daten und Konzepte, die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommen wurden, sind durch die Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bei keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Jan Franke, 21. April 2010